UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

VALDOMIRO DE FREITAS SAMPAIO

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PRECOCE E DA ESTIMULAÇÃO AMBIENTAL SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

VALDOMIRO DE FREITAS SAMPAIO

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PRECOCE E DA ESTIMULAÇÃO AMBIENTAL SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sampaio, Valdomiro de Freitas

Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos. Ribeirão Preto, 2009.

61 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Almeida, Sebastião de Sousa.

1. Desnutrição. 2. Corticosterona. 3. Poliaminas. 4. Ansiedade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Valdomiro de Freitas Sampaio

Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovada em: _____ /_____ /_____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a) _____

Instituição: _____Assinatura: _____

À Sônia, querida esposa, e aos meus filhos, Rafael, Carolina, Lígia e Thaís pelo amor, carinho, apoio e incentivo imensuráveis. Vocês têm meu amor e gratidão eternos.

"... o carinho é anti-oxidante."

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Marcellino de Oliveira (*in memorian*), pela oportunidade, confiança e orientação. Seu entusiasmo, abertura a novas idéias, projetos e planos tornaram este trabalho realidade.

Ao Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida, pela pronta acolhida, incentivo, confiança, pela orientação e finalização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP): Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues, pelos valiosos conselhos, Prof. Dra. Lucila Leiko K. Elias, minha colega de turma, Dra. Dayane Aparecida Gomes, e Maria Valci Aparecida, técnica do laboratório, pela assistência nas análises da corticosterona e proteínas.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição, Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP): Prof. Dr. Julio Sérgio Marchini, pela inestimável assessoria desde o início deste trabalho, e a Gilberto João Padovan, químico do Laboratório de espectrometria de massa, pela assistência nas análises cromatográficas.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição, Desenvolvimento e Comportamento, do Departamento de Psicologia e Educação, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP): Dalmo César Presta Nicola, técnico do laboratório, pela presteza e dedicação, fundamentais na assistência ao cuidado com os animais e testes comportamentais; em especial a meus amigos, Priscila, Roberto, Elimar e Milena, pela participação ativa nos diferentes momentos deste longo trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia da FMRP-USP, onde se realizaram as análises do óxido nítrico: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha e Prof. Fabíola Mestriner.

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), pelas orientações na validação do método cromatográfico das poliaminas.

À Profa. Dra. Cláudia Benedita dos Santos, pela orientação e auxílio no tratamento estatístico.

À minha família, por todo apoio e dedicação, que nunca me deixaram desistir, e sempre acreditaram em mim. Fonte de inspiração e segurança!

E finalmente, porém não menos importante, a Deus, por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas na minha vida!

RESUMO

SAMPAIO, V. F**. Efeitos da desnutrição protéica precoce e da estimulação ambiental sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos**. 2009. 61 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O presente estudo investigou os efeitos da desnutrição protéica e estimulação ambiental sobre parâmetros bioquímicos em ratos. Foram quantificadas as concentrações de poliaminas no córtex frontal, estriado e hipocampo, corticosterona plasmática e atividade da sintase do óxido nítrico no hipocampo. O comportamento exploratório foi analisado no labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais receberam dietas contendo 16% (controles - C) ou 6% (desnutridos - D) de proteína e foram divididos em grupos estimulados ou não estimulados. A desnutrição elevou o nível de corticosterona circulante, diminuiu o conteúdo protéico plasmático e diminuiu a ansiedade. Os ratos não estimulados testados no LCE apresentaram nível elevado de corticosterona circulante, diminuída atividade da NOS no hipocampo, menor conteúdo protéico e de poliaminas no córtex frontal, estriado e hipocampo. A estimulação diminuiu o número de entradas nos braços abertos no LCE nos animais do grupo D e aumentou o número de entradas nos braços fechados nos animais do grupo C. A estimulação aumentou a frequência e tempo gasto em comportamentos de avaliação de risco. Estes resultados sugerem que ambos, a desnutrição e o teste no LCE são situações estressantes, como indicado pela elevação dos níveis de corticosterona. Estes resultados são consistentes com menor ansiedade e/ou maior impulsividade nos animais do grupo D.

Palavras-chave: Desnutrição. Poliaminas. Corticosterona. Ansiedade.

ABSTRACT

SAMPAIO, V. F. **The effects of early protein malnutrition and environmental stimulation on behavioral and biochemical parameters in rats**. 2009. 61 f. Doctoral Thesis - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The present study investigated the effects of protein malnutrition and environmental stimulation on the biochemical and behavioral parameters in rats. It was measured the polyamines concentration in frontal cortex, striatum and hippocampus, as well as the plasma corticosterone levels. The exploratory behavior was analyzed using the elevated plus-maze (EPM) test. Rats received either 16% (well-nourished - W) or 6% (malnourished - M) protein diets and were divided into stimulated or non-stimulated groups. Malnutrition increased corticosterone levels, decreased plasma protein content and anxiety. Non-stimulated rats tested in the EPM increased corticosterone levels, decreased hippocampal NOS activity, decreased frontal cortex, striatum and hippocampus protein and polyamines contents. Stimulation decreased open arm entries in the EPM in M animals and increased the closed arm entries in the W ones. Stimulation increased frequency and time spent in risk-assessment behaviors. These results suggest that both malnutrition and EPM testing are stressing situations as indicated by increased corticosterone levels. These results are consistent with lower anxiety and/or higher impulsiveness in M animals.

Keywords: Malnutrition. Polyamines. Corticosterone. Anxiety.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	hormônio corticotrófico
AMPA	ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiônico
ANOVA	análise de variância
BDNF	fator neurotrófico cerebral
BH4	tetrahidrobiopterina
CaCl2	cloreto de cálcio
CENT	controles estimulados não testados
CET	controles estimulados testados
CNENT	controle não estimulado não testado
CNET	controle não estimulados testados
CORT	corticosterona
CRF	fator liberador de corticotrofina
CV	coeficiente de variação
DENT	desnutridos estimulados não testados
DET	desnutridos estimulados testados
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNENT	desnutridos não estimulados não testados
DNET	desnutridos não estimulados testados
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
eNOS	sintase endotelial do óxido nítrico
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
GR	receptor de glicocorticóide
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC/CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	International Conference on Harmonization
iNOS	sintase induzida do óxido nítrico
LCE	labirinto em cruz elevado
L-NAME	N omega-nitro-L-arginine methyl ester
MPP	mistura de padrões de poliaminas
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	sintase neuronal do óxido nítrico
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
ODC	ornitina descarboxilase
OPA	o-ftaldialdeído
PA	pureza analítica

PCA	ácido perclórico
PM	peso molecular
PSR	resposta das poliaminas ao estresse
PUT	putrescina
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SEM	erro médio padrão
SNC	sistema nervoso central
SPD	espermidina
SPM	espermina
SSAT	espermidina-espermina acetil-transferase
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Má nutrição 13
1.1.1 Panorama atual 13
1.1.2 Desnutrição protéica 14
1.2 Parâmetros bioquímicos em estudo 15
1.2.1 Glicocorticoides 15
1.2.2 Óxido nítrico (NO) 16
1.2.3 Poliaminas 17
1.3 Desnutrição e alterações ambientais no início da vida 19

2 OBJETIVOS 21

3 MATERIAL E MÉTODO 22
3.1 Procedimentos gerais 22
3.2 Equipamentos 24
3.3 Aparelhos e condições cromatográficas 25
3.4 Reagentes 26
3.5 Preparo de soluções 26
3.6 Gradiente de eluição 27
3.7 Procedimento de extração das amostras 28
3.8 Validação da técnica analítica 29
3.9 Avaliação comportamental 29
3.10 Coleta das amostras 30
3.11 Análise das poliaminas 30
3.12 Análise da sintase do óxido nítrico (NOS) 31
3.13 Análise da corticosterona 32
3.14 Análise dos dados 32

4 RESULTADOS 33
4.1 Metodologia cromatográfica 33
4.1.1 Linearidade 33
4.1.2 Precisão 33
4.1.3 Recuperação 35

4.1.4 Modificações no método para detecção da putrescina 35
4.1.5 Limites de detecção e quantificação 35
4.2 Peso dos animais 35
4.3 Análise da corticosterona e proteína plasmáticas. 36
4.4 Análise da proteína tecidual 37
4.5 Análise das poliaminas 39
4.6 Análise da sintase do óxido nítrico (NOS) 42
4.7 Comportamento no labirinto em cruz elevado 44

5 DISCUSSÃO 45

6 CONCLUSÃO 50

REFERÊNCIAS 51

ANEXO – ARTIGO PUBLICADO

1 INTRODUÇÃO

A má-nutrição é um problema mundial que afeta milhões de recém-nascidos e crianças durante os estágios mais vulneráveis de seu desenvolvimento cerebral, comprometendo diversos eventos maturacionais, resultando em alterações morfológicas, neuroquímicas, comportamentais e cognitivas (LEVITSKY; STRUPP, 1995; MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002) Estudos experimentais em animais indicam que tanto a má-nutrição como a deprivação sensorial afetam a aprendizagem e a memória. Por outro lado, a restituição dietética apropriada e a estimulação ambiental podem ajudar a prevenir e, em certos casos, minorar parcialmente estes efeitos (SCHANBERG; BUTLER; SUSKIND, 1978).

1.1 Má nutrição

1.1.1 Panorama atual

Dados da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2001) revelam que cerca de 30% da população mundial sofre de alguma forma de má nutrição, com o resultado devastador de doenças concomitantes e morte, bem como perda do potencial humano e desenvolvimento social.

No mundo, mais da metade das doenças podem estar associadas à fome, ingestão energética inapropriada ou deficiências vitamínicas e de minerais.

A fome, que afeta uma em cada cinco pessoas nos países subdesenvolvidos, é um profundo impedimento ao avanço individual e social (EVANS, 2004).

Para alcançar o objetivo do World Food Summit de reduzir a fome no mundo pela metade em 2015, o número de pessoas famintas necessita cair em 22 milhões por ano. Atualmente, está caindo em 6 milhões por ano. Estima-se que cinco por cento das 12 milhões de mortes infantis anuais estão relacionadas à má nutrição.

No Brasil, a pobreza afeta mais de um quarto da população – em torno de 44 milhões de pessoas (FAO, 2003). Segundo a FAO, 16,7 milhões de pessoas estão subnutridas no Brasil atualmente. Em nove estados do nordeste do país, quase metade de todas as famílias vive com aproximadamente um dólar americano por dia. Embora as porcentagens de crianças com desnutrição grave estejam diminuindo na maioria das regiões, a má nutrição atinge uma quantidade crescente de crianças de 0 a 5 anos de idade.

1.1.2 Desnutrição protéica

O crescimento e a maturação do cérebro são afetados pela deprivação protéica na dieta, sendo o período de amamentação o mais crítico durante o desenvolvimento cerebral (AHMAD; RAHMAN, 1975). A desnutrição não causa patologia morfológica óbvia, como lesão focal, sendo a formação inicial de neurônios susceptível à desnutrição se o período experimental de desnutrição coincidir com o período de neurogênese. Assim, o cerebelo, hipocampo e o sistema olfatório são particularmente afetados pela desnutrição (SHOEMAKER; BLOOM, 1977). A desnutrição pós-natal resulta em um cérebro de menor tamanho, possivelmente não pela redução do número de neurônios, mas com menor tamanho dos mesmos, além de um déficit de mielinização, menor número de espinhas e espessura dendríticas, com déficits no número de contatos sinápticos no giro denteado hipocampal (SHOEMAKER; BLOOM, 1977). Os estudos envolvendo as deficiências no processo de mielinização no sistema auditivo, avaliados pela latência dos potenciais auditivos evocados no tronco cerebral auditivo de ratos, provocados pela desnutrição, realizados em nosso laboratório (ROCINHOLI; DE OLIVEIRA; COLAFÊMINA, 2001), mostraram que a estimulação sensorial levou à recuperação eletrofisiológica dos animais desnutridos, servindo como fundamento para ampliar a estimulação ambiental com a aplicação dos estímulos sonoros, além da estimulação tátil, em nosso estudo.

Várias técnicas podem ser usadas em laboratório para produzir a desnutrição: restrição protéico-calórica, aumento do número de filhotes na ninhada, restrição do período de amamentação dos filhotes. Neste trabalho, a desnutrição foi produzida em ratos pela restrição de proteína na dieta. Neste caso, a dieta hipo-protéica foi mantida isocalórica em relação à dieta dos animais controles pelo acréscimo de carboidratos.

A restrição da disponibilidade de proteínas na dieta reduz a síntese protéica (TORUN; CHEW, 1999; GROFF; GROPPER, 2000). Mesmo as proteínas plasmáticas com rápida reciclagem (“turnover”) são sintetizadas numa taxa 30% a 40% abaixo do normal. Entretanto, a degradação protéica diminui concomitantemente de tal forma que na desnutrição crônica a perda diária de nitrogênio é mínima.

Adaptações levam à economia de proteínas corporais e preservação de funções essenciais dependentes de proteínas. Os hormônios são importantes nos processos metabólicos adaptativos na desnutrição protéico-calórica. Entretanto, os níveis circulantes de hormônios nem sempre explicam mudanças endócrinas na desnutrição protéica, pois as respostas celulares à estimulação hormonal também podem estar alteradas. As alterações hormonais contribuem para a manutenção da homeostase energética através da glicólise e

lipólise aumentadas, maior mobilização de aminoácidos, preservação das proteínas viscerais através da maior utilização das proteínas musculares, diminuição do armazenamento de glicogênio, gorduras e proteínas, e diminuição do metabolismo.

A deprivação protéica é um estímulo crônico sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que preserva a responsividade a outros estressores ao mesmo tempo em que eleva os níveis basais de glicocorticoides (JACOBSON; ZURAKOWSKI; MAJZOUB, 1997; SOBOTKA; COOK; BRODIE, 1974).

Os níveis de globulina carreadora de corticosterona (CBG) estão baixos no período hipo-responsivo ao estresse, e, na desnutrição, ainda mais diminuídos, deixando maior fração livre de corticosterona bioativa circulante (DÁGOSTINHO; HENNING, 1982; SCHMIDT et al., 2005).

Em relação às alterações comportamentais observadas no rato submetido à desnutrição protéica (6% de caseína) durante a lactação, além da reação intensificada a estímulos aversivos (choque, luz intensa, água fria) (BIAGINI et al., 1998; MOREIRA et al., 1997; ROCINHOLI; ALMEIDA; DE OLIVEIRA, 1997; STANTON; GUTIERREZ; LEVINE, 1988), tem sido descrita uma maior exploração do labirinto em cruz elevado (ALMEIDA et al., 1994), em contraste ao controle bem nutrido. O maior número de entrada nos braços abertos e maior tempo gasto nos mesmos sugerem que a má nutrição protéica causa um aumento permanente da impulsividade e/ou maior tendência a explorar a novidade do braço aberto, levando a um comportamento consistente com diminuída ansiedade em animais desnutridos.

1.2 Parâmetros bioquímicos em estudo

1.2.1 Glicocorticoides

A capacidade de responder ao estresse é um dos mecanismos básicos nos mamíferos, e a secreção de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal é característica desta resposta. O rato, já no final do período fetal, secreta glicocorticoide espécie específico, a corticosterona (CORT) em resposta ao estresse.

Os glicocorticoides são geralmente catabólicos, inibindo a divisão celular, síntese protéica e captação de aminoácidos e glicose pelos tecidos. As conseqüências destes eventos são potencialmente sérias para um organismo durante o período no qual predomina o anabolismo. No sistema nervoso central (SNC), a elevação de corticosterona mediada pelo estresse contribui para a atrofia hipocampal, mas não é suficiente para causar morte neuronal.

Os efeitos dos glicocorticoides estendem-se ao desenvolvimento comportamental. Ratos expostos a altos níveis de glicocorticoides durante a primeira semana de vida mostram comportamento social alterado e redução do desempenho em vários paradigmas de aprendizagem (SAPOLSKY; MEANEY, 1986).

Agindo como estresse crônico no rato, a desnutrição protéica prolongada leva à diminuição da expressão do receptor de serotonina 5-HT1_A e da neurogênese no SNC (MIRESCU; PETERS; GOULD, 2004), atrofia hipocampal (LISTER et al., 2005), diminuição do número de receptores de glicocorticoides no hipocampo (DE KLOET; OITLZ; JOËLS, 1999) com conseqüentes alterações na regulação da retroalimentação negativa da corticosterona sobre o eixo HPA e mantida elevação do hormônio corticotrófico (ACTH) e corticosterona circulante (JACOBSON; ZURAKOWSKI; MAJZOUB, 1997), hipotireiodismo (RAMOS et al., 1997) e baixos níveis de fator trófico neural – BDNF (MESQUITA; PEREIRA; ANDRADE, 2002).

1.2.2 Óxido nítrico (NO)

Nos mamíferos, o óxido nítrico (NO) é sintetizado em vários tipos de células, tais como neurônios, células endoteliais e macrófagos por uma família de três isoenzimas chamadas sintases do óxido nítrico (NOS) (KISS; VIZI, 2001; PRAST; PHILIPPU, 2001). A nNOS, ou NOS tipo I, está presente nos neurônios, é constitutivamente expressa e sua atividade é regulada pelo cálcio. Outra NOS constitutiva e dependente de cálcio é a das células endoteliais (eNOS ou NOS tipo III) da vasculatura. Os macrófagos contém uma NOS induzível independente de cálcio (iNOS ou NOS tipo II), que se expressa sob indução pela citocinas. Os neurônios do hipocampo e de outras regiões cerebrais também contém a eNOS (PRAST; PHILIPPU, 2001). Todas as três isoenzimas produzem NO pela oxidação da L-arginina utilizando oxigênio molecular e NADPH como co-substratos. Diferentemente dos neurotransmissores típicos, o NO é sintetizado sob demanda e não é armazenado em vesículas sinápticas e nem liberado por exocitose, mas simplesmente difunde-se pelos terminais nervosos. A distância da difusão do NO (40-300 μ em diâmetro) implica que estruturas na vizinhança da célula produtora, neuronais ou não neuronais, são influenciadas por esta liberação. Isto sugere que, além de agir como neurotransmissor, o NO tem um papel neuromodulador (GARTHWAITE, 1991). Em nosso trabalho, a atividade da NOS total refere-se à soma das atividades da NOS neuronal (tipo I), NOS induzida (tipo II) e NOS endotelial (tipo III), e a atividade da NOS constitutiva refere-se às atividades da NOS neuronal (tipo I) e NOS endotelial (tipo III).

O NO está envolvido na plasticidade sináptica atividade-dependente em várias regiões cerebrais com atuação chave nas funções cognitiva, emocional e/ou comportamental. Durante o aprendizado de esquiva ou exposição a novidades espaciais, a imunoreatividade à NOS aumenta significativamente no hipocampo, córtex somatosensorial e no caudato-putamen (PRAST; PHILIPPU, 2001). Facilitando a transmissão dopaminérgica e glutamatérgica no estriado, o NO participa da integração da informação motora convergente dentro das redes neurais estriatais (WEST; GRACE, 2000).

Em geral a baixa concentração de NO tecidual inibe a atividade de neurônios excitatórios ou inibitórios, enquanto elevados níveis do NO levam à estimulação destes neurônios.

A disponibilidade reduzida de L-arginina pode limitar a produção de NO (O´SHEA; GUNDLACH, 1996; WU et al., 1999). Como o NO é um mediador da resposta imune e é o fator de relaxamento endotelial vascular, a menor síntese de NO pode explicar a imunodeficiência e disfunção cardiovascular em sujeitos com deficiência de proteína ou arginina (WU et al., 1999).

1.2.3 Poliaminas

As poliaminas são cátions alifáticos de baixo peso molecular ocorrendo em quase todas as células do organismo do rato. As poliaminas biogênicas avaliadas neste estudo são a putrescina ($H_2N(CH_2)_4NH_2$), espermidina ($H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$) e espermina ($H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$). A putrescina é sintetizada nos mamíferos a partir da L-ornitina em uma reação catalisada pela ornitina descarboxilase, enzima limitante da síntese de poliaminas. A putrescina e a s-adenosilmetionina descarboxilada são substratos para a síntese de espermidina, que é precursora da espermina.

Entre os vários papeis fisiológicos das poliaminas podemos citar sua atuação como: segundo mensageiro, nutriente, regulador metabólico, fator de crescimento, antioxidante, estabilizador de DNA, RNA e de membranas (WALLACE, 2000).

As células desenvolveram mecanismos para assegurar a rigorosa regulação dos níveis intracelulares de poliaminas através de processos de biosíntese, degradação e transporte das mesmas no organismo. Níveis insuficientes de poliaminas resultam em crescimento sub ótimo e, em alguns casos, morte celular, incluindo apoptose. A elevação descontrolada de poliaminas pode levar à transformação celular e favorecer a gênese tumoral.

Eventos estressantes como a deprivação sensorial levam à inibição da atividade da ornitina descarboxilase (ODC). Esta enzima, a ODC, é reguladora e limitante da síntese de

poliaminas e marcador de proliferação e diferenciação celular (PEGG, 1988; TABOR; TABOR, 1984). A quantidade de ODC é regulada não somente por vários fatores de crescimento, mas também pelas poliaminas ao nível de transcrição, tradução e degradação (TABOR; TABOR, 1984).

Em pH fisiológico, as poliaminas estão protonadas e interagem com vários alvos celulares como ácidos nucléicos e proteínas. A necessidade essencial das poliaminas para o crescimento e diferenciação celular normal pode ser parcialmente atribuída à sua influência na expressão gênica, um processo regulado pelo estado de acetilação das histonas nucleosomais, que está elevada em tumores e em linhagens de células modificadas geneticamente para hiper-expressarem a ODC (CHILDS; MEHTA; GERNER, 2003; HOBBS; PAUL; GILMOUR, 2002).

A ativação precoce do metabolismo cerebral das poliaminas, a chamada "resposta das poliaminas ao estresse" (PSR), é uma reação comum a estímulos estressantes, incluindo os físicos, emocionais e hormonais, com magnitude relacionada à intensidade do estímulo (DIENEL; CRUZ , 1984; GILAD; GILAD, 2003; GILAD et al., 1998).

Entretanto, a PSR varia conforme a idade, pois indivíduos imaturos não mostram o aumento característico da ODC induzido pelo estresse (GILAD et al., 1998). Mudanças na atividade da ODC e nas concentrações tissulares de poliaminas servem como marcadores de PSR (GILAD; RABEY; ELIYAYEV, 2000).

Além de sua importância na síntese protéica, divisão celular e crescimento celular, as poliaminas interagem com diferentes canais iônicos (WILLIAMS, 1997) participando da modulação de eventos sinápticos plásticos. A espermina e espermidina podem modular a função de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) de modo positivo ou negativo. Baixas concentrações de poliaminas acentuam as correntes evocadas pelos canais iônicos NMDA, enquanto altas concentrações de poliaminas inibem estes receptores. Em condições fisiológicas, as concentrações extracelulares destas poliaminas são suficientes para ativar estes receptores, mas não inibi-los (WILLIAMS, 1997).

Quando em concentrações intracelulares fisiológicas basais, as poliaminas bloqueiam os canais iônicos AMPA permeáveis ao cálcio. Entretanto, à medida que o potencial de membrana torna-se suficientemente positivo, a concentração intracelular de poliaminas aumenta, tornando o canal AMPA permeável ao cálcio. Durante a atividade neuronal repetitiva, o bloqueio pelas poliaminas é aliviado, induzindo a facilitação de correntes mediadas pelos canais AMPA. Em animais jovens, os níveis de espermina e de ODC estão aumentados, coincidindo com a maior expressão de canais AMPA sensíveis às poliaminas.

Esta maior facilitação sob altas freqüências de estimulação neuronal sugere que os canais AMPA sensíveis às poliaminas servem como um filtro para aumentar o ganho sináptico durante experiências sensoriais aumentadas (PELLEGRINI-GIAMPIETRO, 2003).

Filhotes de ratas com maior comportamento de lamber e afagar ("high liking, grooming, arching and nursing" ou "hLGAN mothers") apresentam maior capacidade de ligação dos receptores NMDA no hipocampo (com elevação da expressão de sub-unidades NR2A nos receptores NMDA), maior expressão gênica do fator trófico neural BDNF (LIU et al., 2000), com conseqüente elevação da sinaptogênese hipocampal e maior sensibilidade do filhote à estimulação ambiental. Esta elevação da expressão do BDNF é um mecanismo crítico mediando o efeito materno sobre a formação hipocampal (LIU et al., 2000).

Tarefas de aprendizado e memória, que envolvem a mediação do hipocampo, resultam em promoção da neurogênese (CUI; SO, 2004). As poliaminas também desempenham papel importante na neurogênese em mamíferos adultos, esta ocorrendo na camada celular subgranular do giro denteado, e na zona subventricular do ventrículo lateral (MALATERRE et al., 2004), havendo também descrição de neurogênese no córtex pré-frontal (CUI; SO, 2004).

O NO influencia o metabolismo das poliaminas na medida em que inibe tanto a ativação da enzima ornitina descarboxilase como o mecanismo de transporte ativo de poliaminas do meio extracelular para o intracelular. Desta forma, a elevação do NO tecidual tende a diminuir a síntese de poliaminas (SATRIANO et al., 1999).

1.3 Desnutrição e alterações ambientais no início da vida

O uso da estimulação ambiental tem se mostrado uma técnica útil para reduzir ou recuperar parcialmente os efeitos da desnutrição e do isolamento funcional do rato em relação ao ambiente (ROSENZWEIG; BENNET; DIAMOND, 1972). Crnic (1983) descreve que as manipulações ambientais em ratos submetidos à desnutrição protéico-calórica, não melhoraram os parâmetros bioquímicos avaliados, como a menor quantidade de DNA total cerebral, menor tamanho celular no córtex ou tronco cerebral e menor quantidade de lípides cerebrais, concluindo que os efeitos da estimulação sobre o comportamento dos ratos não se dava pela melhora nas alterações cerebrais produzidas pela desnutrição protéico-calórica.

Estudos mais recentes mostraram que a estimulação tátil aumenta a expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo e córtex frontal do rato (JUTAPAKDEEGUL et al., 2003), alterando assim a regulação da síntese hipotalâmica do hormônio liberador de

corticotrofina (CRF) (LADD; OWENS; NEMEROFF, 1996) e a resposta do eixo HPA ao estresse.

A estimulação materna de áreas anogenitais, que se segue à estimulação tátil entre o segundo dia e nono dia pós-natais, é levada via núcleos do tronco cerebral, incluindo neurônios expressando CRF no núcleo de Barrington, para o núcleo paraventricular talâmico, que projeta neurônios para o núcleo central da amígdala, o integrador central das aferências maternas-derivadas e de sinais de estresse. A conseqüência da ativação diária deste circuito é o aumento da expressão gênica do CRF na amígdala central no sexto dia pós-natal (FENOGLIO et al., 2004).

Assim, a cascata de mudanças moleculares eliciadas pela estimulação tátil pode iniciar-se pela elevação da síntese de CRF na amígdala independentemente da elevação de corticosterona no sexto dia pós-natal. Isto pode facilitar a liberação de corticosterona nos dias subsequentes de estimulação tátil. Dado que a expressão de receptores glicocorticoides (GR) permanece inalterada no núcleo paraventricular, as elevações de corticosterona agem inibindo a expressão do CRF no núcleo paraventricular no nono dia pós-natal. A duradoura redução do CRF no núcleo paraventricular, então, diminui a liberação cumulativa de corticosterona por longo tempo, levando ao aumento conseqüente de receptores GR que só se inicia no vigésimo terceiro dia pós-natal, muito mais tardiamente do que as mudanças na expressão hipotalâmica de CRF (FENOGLIO et al., 2004). Esta reprogramação da expressão gênica hipotalâmica é uma mudança precoce na cascata molecular iniciada pela estimulação tátil (FENOGLIO et al., 2004).

A imunoreatividade da sintase de óxido nítrico no hipocampo está alterada em ratos submetidos à estimulação tátil quando comparado com animais controles que não receberam tal estimulação (VAID et al., 1997).

É amplamente aceito que a atividade neuronal tem papel importante na plasticidade sináptica. As neurotrofinas têm emergido recentemente como fator importante da modulação sináptica. As neurotrofinas podem modular a eficácia da transmissão sináptica e o crescimento de dendritos e axônios, os elementos estruturais necessários para a sinaptogênese.

A hipótese prevalente é de que a modulação sináptica atividade-dependente é mediada por fatores neurotróficos. Estímulos fisiológicos relevantes como a atividade física e corrida, restrição dietética, sono, ritmo circadiano e a estimulação tátil afetam a expressão gênica do fator neurotrófico cerebral (BDNF) o qual desempenha importante papel na regulação do nível basal de neurogênese no giro denteado, promovendo a sobrevivência dos neurônios recém gerados (LU, 2003; ROCAMORA et al., 1996).

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho incluíram o estudo das alterações nas concentrações das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) no córtex frontal, estriado e hipocampo, após validação do método bioquímico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, bem como o estudo dos níveis plasmáticos de corticosterona e das alterações comportamentais em ratos submetidos à desnutrição protéica precoce e estimulação ambiental, após exposição ao labirinto em cruz elevado.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Procedimentos gerais

Foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP ratos machos e ratas fêmeas virgens com idade aproximada entre 60 e 65 dias, que foram transportados para o Laboratório de Desnutrição, Desenvolvimento e Comportamento, onde passaram por um período de adaptação ao novo ambiente. Para o período de adaptação (aproximadamente um mês), os ratos machos foram mantidos juntos em gaiolas de polipropileno, medindo 41 x 34 x 17 cm, com tampas de grade em aço inoxidável nas quais há espaço para colocação das dietas e bebedouros de plástico. As gaiolas foram forradas com raspas de madeira. As fêmeas foram colocadas em gaiolas de polipropileno 41 x 34 x 17 em grupos de três fêmeas por gaiola. Depois de passarem pelo período de adaptação, as fêmeas foram levadas para as gaiolas dos machos, na proporção de três fêmeas para cada macho, onde permaneceram durante cinco dias consecutivos.

As ratas que engravidaram foram acompanhadas durante todo o período de gestação, as que não engravidaram foram descartadas no dia do parto.

Todos os filhotes das ratas-mãe nascidos no mesmo dia (intervalo de 24 horas) foram separados de suas mães e agrupados em um conjunto maior. Em seguida, foram separados por sexo e designados aleatoriamente em grupos de oito animais para cada das ratas-mãe.

As ninhadas foram compostas por uma rata-mãe, seis filhotes machos e duas fêmeas, mantidas em gaiola de acrílico medindo 40 x 30 x 20 cm. Estas gaiolas foram preparadas com tampa e três paredes de acrílico transparente, fundo de aço inoxidável e na quarta parede também em aço inoxidável, foi acoplado um túnel (15 x 5 x 5 cm) para a adaptação do comedouro (5 x 5 x 5 cm) que fica a uma altura de 9 cm do piso da gaiola. Há orifícios nas paredes e nas tampas das gaiolas para permitir uma maior ventilação e para que os bebedouros de plásticos possam ser acoplados. As ninhadas foram mantidas nestas gaiolas até o final do período da lactação (21 dias após o nascimento).

Os animais (n = 96) foram divididos em 8 grupos: Controle Não Estimulado Não Testado (CNENT), Controle Não Estimulado Testado (CNET), Controle Estimulado Não Testado (CENT), Controle Estimulado Testado (CET), Desnutrido Não Estimulado Não Testado (DNENT), Desnutrido Não Estimulado Testado (DNET), Desnutrido Estimulado Não Testado (DENT), Desnutrido Estimulado Testado (DET), conforme descrito na tabela 1.

Os controles receberam dietas contendo 16% de proteína, enquanto os desnutridos receberam dietas contendo 6% de proteína no período da lactação (0 a 21 dias de idade) e pós-

lactação (22 a 35 dias de idade). Os demais componentes da dieta (lipídeos 8,0%, sais minerais 5,0%, vitaminas 1,0%, colina 0,2%) foram mantidos constantes, sendo que a redução das proteínas foi compensada com o aumento de 10,0% no conteúdo de carboidratos (passando de 69,8% para 79,8%) mantendo a dieta isocalórica. Foi acrescentado L-metionina na proporção de 2 g/kg de proteína.

As dietas de 16% de proteína e de 6% de proteína foram preparadas no próprio Laboratório de Nutrição, Desenvolvimento e Comportamento, respondendo às proporções de nutrientes recomendadas pela AIN (American Institute of Nutrition) e AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) como descrito por Reeves, Nielsen e Fahey (1993) e Rocinholi, Almeida e De Oliveira (1997). Durante este período foi medida diariamente a ingestão de dietas até 21 dias. As ratas-mãe foram pesadas individualmente e os filhotes (seis machos e duas fêmeas) foram pesados semanalmente em conjunto (dias 0, 7, 14 e 21). Foi também feita a pesagem individual dos animais nos dias 21, 28 e 35 da pós-lactação.

Os animais, após o período da lactação (21 dias), foram separados de suas ratas-mãe e colocados em gaiolas individuais de polipropileno medindo 30 x 19 x 13 cm, com tampas de aço inoxidável e bebedouros de plástico acoplados. Nesse período (dos 21 aos 35 dias de idade), os animais receberam a mesma dieta do período da lactação.

Tabela 1- Distribuição dos grupos de animais conforme as variáveis experimentais em estudo

Variáveis experimentais				
Grupos	Dieta	Estimulação	Teste	n
CNENT	16%	N	N	12
CNET	16%	N	S	12
CENT	16%	S	N	12
CET	16%	S	S	12
DNENT	6%	N	N	12
DNET	6%	N	S	12
DENT	6%	S	N	12
DET	6%	S	S	12

* N = não, S = sim

Na fase de lactação, as ratas-mãe das ninhadas dos grupos CENT, CET, DENT E DET foram temporariamente separadas e colocadas em gaiolas individuais. Os filhotes foram mantidos no ninho recobertos com uma manta de algodão, para manutenção da temperatura corporal, e retirados individualmente para o procedimento de estimulação ambiental

(handling), que consiste em segurar cada filhote com uma das mãos e o polegar da outra mão, deslizando suavemente na parte dorsal do animal no sentido encéfalo-caudal durante três minutos, conforme descrito por Lima et al. (1993).

Ao termino dos 3 minutos de manipulação, os animais foram agrupados em suas ninhadas, e transportados, sem as ratas mães, para uma sala distante 24 m do biotério, onde a ninhada em conjunto recebeu estímulos auditivos durante 3 minutos, apresentando tons puros de 70 dB e 3 Khz por 3 segundos e intervalos de 25 segundos entre tons. Na fase de lactação, após esta estimulação, as ninhadas foram transportadas para o biotério e colocadas com a suas ratas mães. As ninhadas dos grupos não estimulados também retornaram para as gaiolas com suas próprias mães. Após a lactação, dos 22 aos 35 dias, o mesmo procedimento de estimulação sonora foi mantido para os animais dos grupos estimulados sendo os animais colocados em grupos de seis, retornando para suas gaiolas individuais após a estimulação sonora.

Os filhotes dos grupos CNENT, CNET, DNENT, e DNET não foram estimulados, sendo somente separados de suas mães e também envolvidos em algodão para a manutenção da temperatura corporal.

No trigésimo sexto dia, os animais dos grupos testados (CNET, CET, DNET, DET) foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Após o teste, os animais voltaram para o biotério onde permaneciam por exatos trinta minutos.

Decorridos os 30 minutos, os animais foram decapitados numa sala próxima, isolada do biotério, observando um tempo menor que trinta segundos entre a retirada de sua gaiola do biotério e a decapitação. Todos os grupos foram decapitados entre 08:00 e 10:00 da manhã, observando o período de nadir do eixo HPA (GUILLEMIN; DEAR; LIEBELT, 1959). Após o sacrifício, os animais tiveram o sangue do tronco coletado e o cérebro dissecado para as análises.

3.2 Equipamentos

A análise comportamental foi realizada no labirinto em cruz elevado (LCE). O LCE era feito de madeira e consistia de dois braços abertos (50 x 10 cm) opostos um ao outro, cruzando com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), com o teto aberto (PELLOW et al., 1985). O labirinto ficava elevado 50 cm acima do piso. Uma luz fluorescente (40 W) no teto iluminava a sala experimental. Todos os testes ocorreram pela manhã entre 08:00 e 10:00 horas. Os trajetos percorridos pelo animal num período de 5 minutos foram registrados por

uma câmera de vídeo fixada no teto da sala, para análise posterior de algumas categorias comportamentais além das medidas de tempo clássicas do teste.

Um molde de acrílico milimetrado, como o apresentado na figura 1, foi utilizado na coleta das amostras.

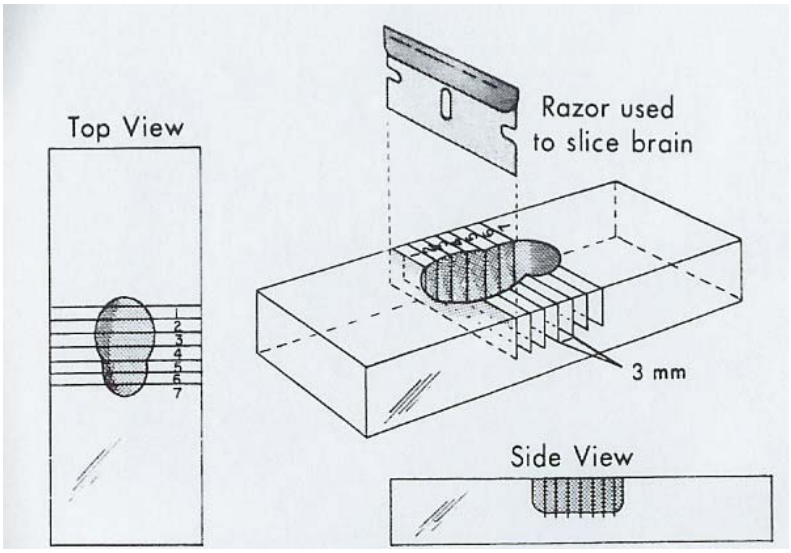

Figura 1- Molde de acrílico milimetrado (JACOBOWITZ , 1974)

3.3 Aparelhos e condições cromatográficas

Na determinação quantitativa das poliaminas no tecido cerebral, foi empregado cromatógrafo da Shimadzu Corporation modelo LC-10AD, equipado com duas bombas de alta pressão modelo Shimadzu LC-10AD, bomba para mistura de gradientes Shimadzu CBM-10 A, auto-sampler Shimadzu SIL-10A, forno modelo Shimadzu CTO-10 A para aquecimento da coluna à temperatura de 37^{o}C. Para a separação das poliaminas foi utilizada uma coluna contendo fase ligada de octadecilsilano (C18) da marca LiChrospher® 100 RP 18 da Merck-Germany, 120x4,0 mm d.i., com diâmetro de partícula de 5 µm. O fluxo dos gradientes na coluna foi mantido a 1,2 mL/min. Foi utilizada uma bomba de baixa pressão da Milton Roy Company com fluxo de 0,45 mL/min. para a reação de derivatização pós-coluna com o o-ftaldialdeído (OPA). O efluente da coluna e o OPA foram misturados em uma conexão em T, e, após passar por uma espiral de polipropileno (1m x 0,5 mm d.i.), conforme descrito por Seiler e Bolkenius (1985), mantida em um banho em água a uma temperatura de 54^{o}C controlada por um termostato no equipamento Banho Maria Fanen modelo 100, a mistura efluente-reagente passou por um detector de fluorescência da marca Shimadzu modelo

RF535, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 345 nm e 455 nm, respectivamente.

3.4 Reagentes

Foram adquiridos os padrões das poliaminas para putrescina (putrescine (1,4-diaminobutane) 99% - Sigma-D13208 com peso molecular (PM) de 88,15), espermidina (spermidine free base - Sigma-S2626 com PM=145,25), espermina (spermine free base - Sigma-S3256 com PM=202,34) e o padrão interno (1,7-diaminoheptane - Sigma-32990 com PM=130,23). O octanosulfonato de sódio (1-octanesulfonic acid sodium salt – Vetec Brasil com PM=234,29), o o-ftaldialdeído (opa/phthaldialdeyde – Acros com PM=134,13) e o detergente Brij35 (Acros com PM=1198) foram de grau de pureza para HPLC. O ácido perclórico PA a 70% (Cinética Química Brasil), a acetonitrila (JT Baker), o acetado de sódio PA (Merck), o hidróxido de potássio, etanol, 2-mercaptoetanol, ácido acético PA (Vetec Brasil) e ácido bórico PA (Vetec Brasil) foram de grau analítico. Filtros MILLEX-GS de 13 mm de diâmetro com poros de 0,22 μm da marca Millipore (JBR13GP05) foram adquiridos. A água utilizada foi obtida com o sistema Milli-Q (Millipore). Para a dosagem de proteínas foi utilizado o método de ligação do Coomassie blue (BRADFORD, 1976) usando o reagente Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD Protein Assay) e albumina bovina (PIERCE Protein assay reagents).

3.5 Preparo de soluções

(a) Tampão A: solução de acetato de sódio a 0,1 Molar e octanosulfonato de sódio a 0,01 Molar: obtida pela adição de acetato de sódio (16,41 g) e de octanosulfonato de sódio (4,69 g) a água Milli-Q (2.000 mL), tendo o pH ajustado para 4,5 com ácido acético.

(b) Tampão B: solução de acetato de sódio a 0,2 Molar e octanosulfonato de sódio a 0,01 Molar: obtida pela adição de acetado de sódio (32,81 g) e de octanosulfonato de sódio (4,69 g) a água Milli-Q (2.000mL), tendo o pH ajustado para 4,5 com ácido acético. A uma alíquota desta solução adiciona-se acetonitrila numa proporção 10:3 (v/v) para formar o tampão B. Ambos os tampões (A e B), após agitação, foram filtrados com filtro de celulose (ou nylon) de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro para fase orgânica.

(c) Solução de ácido bórico: obtida adicionando ácido bórico (12,34 g) e hidróxido de potássio a 25% (25 mL) a água Milli-Q (1.000 mL), tendo o pH desta solução sido ajustado para 10,4 com solução de hidróxido de potássio a 50%.

(d) Solução de OPA-metanol: obtida misturando-se 400 mg de OPA a 5 mL de metanol .

(e) Solução do reagente de derivatização OPA-2-mercaptoetanol: obtida misturando-se a solução de ácido bórico (227,3 mL), BRIJ35 a 30% (6,82 mL), 2-mercaptoetanol (4,55 mL) e solução OPA-metanol (11,36 mL). O reagente de derivatização deve ser armazenado em frasco escuro protegido da luz e com pressurização constante com gás hélio.

(f) Solução de ácido perclórico (PCA) a 0,2 Molar: obtida pela adição de 4,31 mL de PCA a 70% (PM = 100,46, densidade = 1,664 g/mL) a água destilada (250 mL).

(g) Solução de padrão interno para adição às amostras: obtida adicionando-se 1,7-Diaminoheptano (0,039 mg) a 10 mL de tampão A, o que resulta numa concentração de 300 nMoles/mL.

(h) Mistura dos padrões de poliaminas (MPP) para a curva padrão e corridas de calibração, composta de:

(1) 40 µL da solução de 1,7-Diaminoheptano (padrão interno) a 13.822 nMolar**,** obtida adicionando-se 0,09 mg de padrão interno a 50 mL de tampão A .

(2) 160 µL da solução de 1,4-diaminobutano (putrescina) a 846,3 nMolar, obtida adicionando-se 0,000373 mg de putrescina a 5 mL de fase A .

(3) 30 µL de solução de N-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano (espermidina) a 63,7 µMolar, obtida adicinando-se 0,23131 mg de espermidina a 25 mL de fase A .

(4) 8 µL da solução de N,N´-Bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano (espermina) a 32.122 nMolar, obtida adicionando-se 0,03250 mg de espermina a 5 mL de fase A .

(5) 5.000 µL do tampão A

Ao final, a MPP conterá: putrescina (6,77 nMoles), padrão interno (44,22 nMoles), espermidina (76,44 nMoles) e espermina (51,40 nMoles).

3.6 Gradiente de eluição

Para as análises no HPLC foi utilizado o gradiente de tampões descrito na tabela 2. O fluxo na coluna foi de 1,2 mL/min., o tempo de corrida para a eluição das poliaminas de cerca de 17 minutos, o tempo de equilíbrio da coluna de 8 minutos, com tempo total de análise de 25 minutos.

Tabela 2- Gradiente de eluição dos tampões usados no método

		Tampão A	Tampão B	Tampão A	Tampão B
	Tempo de eluição (min.)	%	%	fluxo	fluxo
				mL/min.	mL/min.
	0	50	50	0,6	0,6
	10	25	75	0,3	0,9
	12	0	100	0	1,2
	16	0	100	0	1,2
	17	50	50	0,6	0,6
Tempo Equilíbrio (min.)	8				
Tempo Total (min.)	25				

3.7 Procedimento de extração das amostras

O procedimento de extração deu-se conforme descrito por Löser, Wunderlich e Fölsch (1988). As amostras, após pesagem a fresco, foram congeladas a -70^{0}C tendo sido relatado que sob esta condição pode-se aguardar até no máximo 6 meses para posterior análise (HALLINE; DUDEJA; BRASITUS, 1989).

No dia da análise, após descongelar a amostra à temperatura ambiente, foi adicionada solução salina a 0,9% no ependorf contendo a amostra numa proporção 1:20 (peso (g)/volume (mL)) seguido de homogeneização com sonicador (Ultrassonic Processor Modelo GE 130PB) por 4 vezes de 5 segundos. Foi aspirado 250 µL do homogeneizado e colocado em outro ependorf sendo o restante armazenado novamente no freezer a -70^{0}C para posterior quantificação de proteinas. Ao homogeneizado foi adicionado 50 µL de padrão interno (1,7-diaminoheptano, 300 nMoles/mL) e 700 µL de ácido perclórico (PCA) a 70% 0,2 Molar. Então, a amostra com o padrão interno e PCA foi centrifugada a 3.200g por 5 minutos e o sobrenadante passado por filtro Millex de 0,22 µm e 20 µL foi injetado no HPLC.

A MPP, utilizada na rotineira calibração para a obtenção da curva analítica, a qual se fazia antes das análises das amostras, continha, num volume de 20 µL injetado, 27,08 picomoles de putrescina, 176,92 picomoles de padrão interno (1,7-diaminoheptano), 305,76 picomoles de espermidina e 205,6 picomoles de espermina, permitindo a construção de curva padrão das poliaminas mostrada na figura 2.

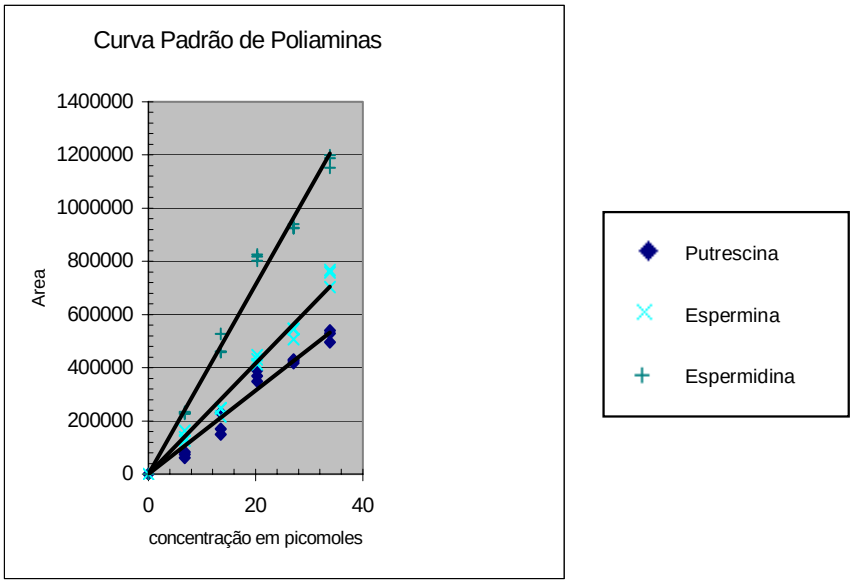

Figura 2- Curva padrão de poliaminas

3.8 Validação da técnica analítica

A validação da técnica analítica, confirmando sua aplicabilidade ao propósito intencionado, foi efetuada, com determinação dos parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e recuperação, seguindo recomendações para validação de métodos bioanalíticos proposto pelo FDA (UNITED STATES, 2001) e pela ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, 2005).

Os resultados obtidos nas concentrações de poliaminas nas determinações das amostras usando este método foram expressos em nanomoles de poliamina por grama de tecido fresco, conforme já publicado na literatura (ADIBHATLA et al., 2002; JÄNNE; RAINA; SIIMES, 1964; SHASKAN; HARASZTI; SNYDER, 1973).

3.9 Avaliação comportamental

Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto, com a face para um braço fechado, e podia explorá-lo por 5 minutos. As sessões experimentais foram gravadas por uma câmera de vídeo montada verticalmente sobre o LCE e analisada posteriormente usando o software X-Plo_Rat 2005 versão 1.1.0, desenvolvida no Laboratório

de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP), disponível em http://scotty.ffclrp.usp.br. Os seguintes comportamentos foram analisados: 1) porcentagem de entradas nos braços abertos (uma entrada no braço definida como o rato tendo as quatro patas dentro do braço), 2) o tempo gasto nos braços abertos, 3) entradas nos braços fechados, 4) "rearing" (elevação sobre as patas traseiras), 7) "head-dipping" (vasculhando sobre os braços do labirinto em direção ao piso), 8) postura de "stretch-attend" (alongamento da cabeça e ombros para frente seguido de retração para a posição original). As categorias comportamentais "stretch-attend" e "head-dipping" foram previamente descritas como comportamentos de avaliação de risco (MOREIRA et al., 1997).

3.10 Coleta das amostras

Após a decapitação, os animais tiveram o sangue coletado para a análise de corticosterona, sendo os tubos mantidos a 4^0C. A seguir, os animais tiveram o cérebro dissecado com auxílio de molde de acrílico milimetrado, conforme a figura 1, excisando-se sob lupa o córtex frontal, o estriado, dissecado com as paredes externas dos ventriculos laterais como limite interno e o corpo caloso como limite externo, o hipocampo, após retirada de uma fatia de dois milimetros entre lâminas de gilete colocadas no molde de acrílico milimetrado, à frente dos corpos mamilares.

Imediatamente após a dissecção, os tubos com material destinados à dosagem do óxido nítrico foram colocados em gelo seco e os tubos com material para dosagem de poliaminas deixados em gelo (4^0C) para não desidratar. O material dos tubos para determinação das poliaminas, após pesagem em balança de precisão, foram congelados a -70^0C até análise posterior. Os tubos para determinação do óxido nítrico também foram armazenados a -70^0C para posterior análise. Os tubos contendo o sangue para determinação da corticosterona, sem anticoagulante, foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos, sendo o soro armazenado a -70^0C para posterior análise.

3.11 Análise das poliaminas

Após a extração das amostras, uma alíquota do sobrenadante contendo o padrão interno foi injetada no HPLC, sendo as poliaminas quantificadas, após passarem pelo detector de fluorescência, através da análise dos cromatogramas obtidos, como o ilustrado na figura 3, que mostra os tempos de retenção da putrescina de cerca de 6 minutos, padrão interno de 11 minutos, espermidina de 14 minutos e espermina de 16 minutos na análise de uma amostra de tecido cerebral do rato.

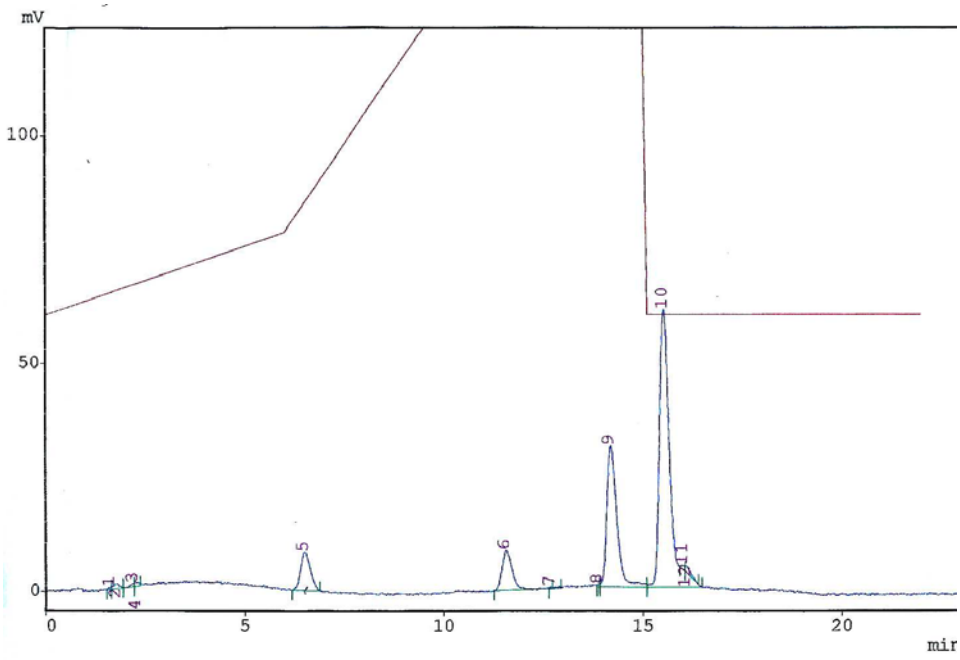

Figura 3- Cromatograma de amostra exibindo os picos de retenção da putrescina (5), padrão interno (6), espermidina (9) e espermina (10)

3.12 Análise da sintase do óxido nítrico (NOS)

A determinação da atividade da NOS no hipocampo foi realizada por meio de uma modificação do método descrito por Bredt e Snyder (1989). Resumidamente, os fragmentos foram homogeinizados em 0,2 ml de tampão de homogeinização gelado contendo: Tris 50 mM (Sigma), pH 7,4, 3,2 mM sacarose, 1 mM EDTA, 10 µg/ml Leupeptin (Sigma), 1 mM de dithiothreitol (DTT, Sigma), 10 µg de soybean trypsin inhibitor/ml (Sigma), e 2 µg de aprotinin/ml (Sigma), 1 mM de Phenyl methyl sulfonyl fluoride (Sigma). O homogeinato foi centrifugado a 10.000g por 10 min a 4°C. Quarenta microlitros do sobrenadante foram adicionados a 100 µl do tampão de ensaio: 20 mM HEPES (Sigma), 1,25 mM CaCl2 , 1 mM DTT e 100 mM Tetrahydrobiopterin (BH4, Sigma), 120 µM Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH, Sigma) e 100.000 cpm de [14C]-L-arginine (270 µCi/mmol, 0,21 µmol) e incubando-se por um período de 15 min em banho-maria a 37ºC e agitação de 50 ciclos/min. No final deste período (15 min) a reação foi encerrada adicionando-se 1 ml de resina de troca catiônica (Dowex® 50W×8 hydrogen form, Sigma) gelada, previamente ativada com NaOH e diluída em 100 mM Hepes, 10 mM EDTA, pH 5.5). A resina foi removida por centrifugação (10.000g, 10 min, 4°C) e 400 µl do sobrenadante contendo L-citrulina foi adicionado em um frasco contendo 3 ml de líquido de cintilação (ScintiSafeTM, Fisher Scientific) e colocado para determinar a quantidade de [14C]-citrulina

em contador de cintilação beta. Como a sintase do óxido nítrico converte a arginina em citrulina e óxido nítrico, em concentrações equimolares, os resultados foram expressos como óxido nítrico produzido por tecido (pmol/min./mg de proteína). Alíquotas de 10 µl do homogeinato foram utilizadas para dosagem de proteína pelo método de ligação do Coomassie blue usando o reagente Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD Protein Assay) e albumina bovina (PIERCE Protein assay reagents).

3.13 Análise da corticosterona

Os níveis plasmáticos de CORT foram obtidos por método de radio-imuno-ensaio específico, após extração com etanol, como previamente descrito (ELIAS, 1997, 2004). O anticorpo anti-corticosterona foi gentilmente cedido pelo Dr. José Gilberto Vieira (Universidade Federal de São Paulo, Brasil), a 1,2,6,7-3H-corticosterona foi adquirida da GE Healthcare Life Sciences (USES). A sensibilidade do ensaio e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 0.4 µg/dL, 5.1% e 8.4%, respectivamente.

3.14 Análise dos dados

Constatada a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) dos fatores dieta, estimulação e teste no LCE, seguido, quando necessário, da análise *post-hoc* através do teste de Newman-Keuls. A análise do óxido nítrico deu-se através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para detectar diferenças entre as medianas das vinte e oito comparações possíveis entre os diferentes grupos experimentais, com correção do nível de significância para múltiplas comparações (SHESKIN, 2004).

Para a análise dos dados foi utilizado o programa Statistica, versão 6.0, e foi considerado nível de significância um valor de $\alpha < 0,05$ para os testes paramétricos e $\alpha < 0,002$ para os testes não paramétricos.

4 RESULTADOS

4.1 Metodologia cromatográfica

4.1.1 Linearidade

A linearidade da resposta das poliaminas no detector foi examinada para assegurar que o procedimento pode ser usado para análise quantitativa. Para tanto, realizou-se a construção das curvas analíticas a partir da mistura obtida pela adição de 200 µL da MPP a 200 µL de fase A e análise de triplicatas de 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL e 50 µL desta nova solução. A análise de regressão linear para a relação entre concentração injetada e a resposta do detector para a putrescina (PUT), espermidina (SPD) e espermina (SPM) está representada na tabela 3, que mostra os coeficientes de correlação e as equações das retas.

Tabela 3- Análise de regressão linear para a relação entre a concentração e a área dos picos de putrescina (PUT), espermidina (SPD) e espermina (SPM

Composto	coef.corr.(r)	Inclinação (a) ± SD	Intercepto-X	Intercepto-Y (b)
PUT	0,981631	16530 ± 858,8	1,233	-20380±18670
SPD	0,992018	3093 ± 105,2	-5,579	17260±25830
SPM	0,990051	2865 ± 108,9	8,071	-23130±17970

4.1.2 Precisão

A precisão, definida como o grau de concordância entre resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado a múltiplas amostragens de uma amostra homogênea, foi realizada avaliando a repetibilidade, ou precisão intra-ensaio ou intra-dia, e a precisão intermediária ou entre-ensaios ou entre-dias (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Foram utilizados três cérebros inteiros de ratos Wistar machos que foram submetidos ao mesmo processo de extração descrito acima, cada cérebro fornecendo uma solução homogênea. De cada solução homogênea foram retiradas 15 amostras que foram analisadas em quintuplicata (intra-dia, n = 5) e triplicata (entre-dias, n = 15).

Nos estudos de precisão e recuperação não aparecem os dados relativos à putrescina, a concentração da qual, nas amostras utilizadas, encontrava-se abaixo do limite de detecção.

Os coeficientes de variação intra- e entre-dias obtidos no cálculo da precisão do método estão sumarizados na tabela 4 e 5 e estão de acordo com o esperado (≤ 20%) (UNITED STATES, 2001).

Tabela 4- Cálculo da precisão intra-dia em quintuplicata apresentando a média (picomoles), desvio padrao (SD), erro médio padrão (SEM) e coeficiente de variação (CV) das medidas

Precisão intra-dia								
SPD					SPM			
DIAS	1	2	3		DIAS	1	2	3
MEDIA	287,8	291,5	236,7		MEDIA	126,2	115,7	83,19
SD	3,234	11,45	5,538	ANIMAL 1	SD	24,14	3,884	6,073
SEM	1,867	6,612	2,477		SEM	13,94	2,746	3,037
CV	1,12%	3,93%	2,34%		CV	19,13%	3,36%	7,30%
DIAS	1	2	3		DIAS	1	2	3
MEDIA	229,2	268,2	254,6		MEDIA	84,21	117,8	104,1
SD	5,739	22,53	15,02	ANIMAL 2	SD	4,759	10,41	11,54
SEM	2,869	10,08	6,718		SEM	2,128	4,655	5,161
CV	2,50%	8,40%	5,90%		CV	5,65%	8,84%	11,08%
DIAS	1	2	3		DIAS	1	2	3
MEDIA	277,4	243,4	218,3		MEDIA	69,96	163,5	39,01
SD	25,44	8,075	2,814	ANIMAL 3	SD	11,57	20,09	0,891
SEM	11,38	4,038	1,625		SEM	5,176	11,6	0,4455
CV	9,17%	3,32%	1,29%		CV	16,54%	12,29%	2,28%

Tabela 5- Cálculo da precisão entre 3 dias (n = 15) apresentando a média (picomoles), desvio padrao (SD), erro médio padrão (SEM) e coeficiente de variação (CV) das medidas

Precisão entre-dias			
		SPD	SPM
ANIMAL 1	MEDIA	267,40	101,70
	SD	29,40	19,73
	SEM	8,16	6,24
	CV	10,99%	19,40%
ANIMAL 2	MEDIA	249,10	102,00
	SD	24,52	16,71
	SEM	6,33	4,31
	CV	9.84%	16,37%
ANIMAL 3	MEDIA	252,60	73,44
	SD	36,89	10,47
	SEM	9,53	3,70
	CV	14,60%	14,26%

4.1.3 Recuperação

Para a análise da recuperação das poliaminas, foi utilizado o cérebro inteiro de um rato Wistar macho. Para os estudos de recuperação, 15 amostras de uma solução homogênea, obtida pelo mesmo processo de extração tecidual descrito acima, foram analisadas em triplicata com e sem adição de conhecidas quantidades de padrões de poliaminas. As recuperações foram de 92,56% para a espermidina e 84,47% para a espermina.

4.1.4 Modificações no método para detecção da putrescina

O maior volume de injeção da amostra no HPLC, passando de 20 μL para 30 μL, com conseqüente aumento da massa injetada de 1,5 vezes, não resultou em sucesso na detecção da putrescina nas amostras de tecido cerebral. Posteriormente, na tentativa de detecção da putrescina, concentramos a amostra de tal forma que a massa injetada quintuplicou. Para tanto, a diluição original com salina proposta por Löser, Wunderlich e Fölsch (1988) de 1:20 foi reduzida para 1:10 e o volume de PCA reduzido da proporção original de 2,8:1 (volume homogenato/volume de PCA) para 1,2:1. O volume de padrão interno a ser adicionado permaneceu na mesma proporção original que é de 1/5 do volume do homogenato. Assim, por exemplo, a um volume de homogenato de 250 μL, originalmente tinhamos que adicionar 50 μL de padrão interno, o que mantivemos, e 700 μL de PCA, o que foi mudado para 300μL. Finalmente, para elevar a massa injetada de 5 vezes, injetamos 30 μL no HPLC. Estas alterações no método tiveram sucesso na detecção da putrescina.

4.1.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção para cada poliamina foram calculados considerando-se um nível de sinal/ruído maior que 2:1. Assim, obtivemos os seguintes limites de detecção: 0,11 picomoles para a PUT, 27,56 picomoles para a SPD e 20,69 picomoles para a SPM.

O limite de quantificação, a menor concentração de analito que fornece uma respota que pode ser quantificada acuradamente, foi de 0,22 picomoles para a PUT, 76,44 picomoles para a SPD e 51,40 picomoles para a SPM, observando-se uma relação sinal/ruído de 10:1.

4.2 Peso dos animais

O peso dos animais durante a lactação e pós-lactação está descrito na tabela 6. A ANOVA não mostrou diferenças no peso ao nascer [$F(1,13) = 0,31$; $p > 0,05$] dos animais designados às diferentes condições de dieta. Entretanto, ao final do período de lactação, no vigésimo primeiro dia de vida, houve efeito significativo de dieta [$F(1,100) = 466.36$; $p < 0.001$], com menor peso

entre os desnutridos. Além disso, houve efeito significativo de estimulação [F(1,100) = 7,75; p < 0,01], com menor peso entre os estimulados, quando comparados com os não estimulados, entre os bem nutridos. Finalmente, houve significativa interação entre dieta e estimulação [F(1,100) = 4,61; p < 0,05]. Aos 35 dias de vida, houve apenas efeito significativo de dieta [F(1,100) = 820,42; p < 0,001], com menor peso entre os desnutridos.

Tabela 6- Peso médio ± SEM dos filhotes ao 0, 21 e 35 dias de vida (n = 96)

grupos	dias	média ± SEM
CNE	0	8,87 ± 0,40
	21	56,53 ± 1,89
	35	141,8 ± 4,81
DNE	0	8,79 ± 0,87
	21	21,97 ± 0,57
	35	27,41 ± 1,02
CE	0	8,58 ± 0,67
	21	49,35 ± 1,98
	35	127,9 ± 5,40
DE	0	7,95 ± 0,40
	21	21,05 ± 0,73
	35	27,75 ± 1,14

4.3 Análise da corticosterona e proteína plasmáticas.

Os resultados das análises estatísticas sobre a CORT estão representados na tabela 7. Houve efeito significativo de dieta [F(1,88) = 57,89, p<0,001] com os desnutridos apresentando valores mais elevados de CORT quando comparados com os animais bem nutridos. Houve também efeito significativo do teste [F(1,88) = 9,70, p<0,05] com os animais testados apresentando níveis mais elevados de CORT quando comparados aos animais não testados. Nenhum efeito de estimulação foi observado.

Tabela 7- Concentração da CORT plasmática (µg/dL) nos diferentes grupos experimentais (n = 96)

CORT (média ± SEM)			
Grupos	µg/dL	Grupos	µg/dL
CNENT	0,78 ± 0,08	DNENT	8,51 ± 1,43
CNET	4,33 ± 0,46	DNET	14,55 ± 1,08
CENT	4,15 ± 0,79	DENT	9,24 ± 1,54
CET	5,81 ± 0,83	DET	8,29 ± 1,76

ANOVA + Newman-Keuls "*post-hoc*": dieta vs. estimulação [F(1,88) = 9,48, p = 0,002]: CNE < CE (p < 0,05), CNE < DNE (p < 0,001), CE < DE (p < 0,001), DE < DNE (p < 0,05); estimulação vs. teste [F(1,88) = 7,25, p = 0,008]: NENT < NET (p < 0,001), ET < NET (p < 0,05).

Foi observada interação significativa entre dieta e estimulação [F(1,88) = 9,49, p<0,01]. Análise *post-hoc* pelo teste de Newman-Keuls mostrou que a estimulação ambiental aumentou significativamente a CORT entre os bem nutridos (p<0,05) enquanto diminuiu significativamente nos desnutridos (p<0,01). Houve também interação significativa entre estimulação e teste [F(1,88) = 7,25; p<0,01] com a análise *post-hoc* pelo teste de Newman-Keuls mostrando significante aumento da CORT como resultado do teste nos animais não estimulados (p<0,05) enquanto o teste não altera os níveis de CORT entre os animais estimulados.

Os resultados das análises estatísticas da proteína plasmática total estão representados na tabela 8.

Tabela 8- Concentração da proteína plasmática (g/dL) nos diferentes grupos experimentais (n = 96)

Proteína plasmática (média ± SEM)			
Grupos	g/dL	Grupos	g/dL
CNENT	6,99 ± 0,19	DNENT	4,44 ± 0,22
CNET	5,71 ± 0,26	DNET	4,37 ± 0,30
CENT	6,41 ± 0,10	DENT	5,11 ± 0,24
CET	6,34 ± 0,21	DET	4,37 ± 0,29

ANOVA + Newman-Keuls "*post-hoc*": dieta vs. estimulação vs. teste [F(1,95) = 8,10, p < 0,005]: D < C (p < 0,001), DNENT < DENT (p < 0,05), CNET < CNENT (p < 0,01).

A análise da proteína plasmática total mostrou efeito significativo de dieta [F(1,95) =117,76, p<0,001] com os bem nutridos apresentando valores mais elevados quando comparados aos desnutridos. Houve também efeito significativo de teste [F(1,95) = 10,72, p<0,001] com os animais testados apresentando níveis mais baixos de proteína plasmática quando comparados com os não testados. Finalmente, houve também interação significativa entre dieta, estimulação e teste [F(1,95) = 8,10, p<0,05]. A análise *post-hoc* mostrou que o teste no LCE diminuiu os níveis de proteína plasmática nos animais bem nutridos não estimulados (p<0,05) mas não afetou os bem nutridos estimulados.

4.4 Análise da proteína tecidual

Os resultados da determinação da proteína tecidual no córtex frontal, estriado e hipocampo estão representados na tabela 9. No córtex frontal não houveram diferenças devido à dieta, estimulação ou teste, mas foi demonstrado interação significante entre estimulação e teste [F(1,83) = 5,61, p<0,05]. A análise *post-hoc* mostrou que o teste no LCE diminui

significativamente os níveis de proteína tecidual entre os animais não estimulados ($p<0,05$), sem diferença nos estimulados. No estriado não houveram diferenças significativas devido à dieta e estimulação, mas houve efeito significante do teste [$F(1,68) = 4,06$, $p<0,05$] apresentando os animais testados no LCE menores níveis de proteína tecidual quando comparado com os não testados. Houve também interação significativa entre dieta e estimulação [$F(1,68) = 4,19$, $p<0,05$] com a análise *post-hoc* mostrando que a estimulação aumentou significativamente os níveis de proteína nos bem nutridos ($p<0,05$) enquanto diminuiu nos desnutridos ($p<0,05$).

Tabela 9- Concentração (média ± SEM) da proteína tecidual (mg/g) nos diferentes grupos experimentais (n = 96) no córtex frontal (CF), estriado (ES) e hipocampo (HC)

Grupos (CF)	Proteína (mg/g tec.)	
A x B	A	B
CNENT x CNET	236,4 ± 50,23 *	124,1 ± 20,71
CENT x CET	208,5 ± 32,80	254,7 ± 32,54
DNENT x DNET	220,6 ± 29,24 *	159,2 ± 13,46
DENT x DET	193,8 ± 18,18	171,1 ± 9,54

ANOVA + Newman-Keuls "*post-hoc*": estimulação vs. teste [$F(1,83) = 5,61$, $p < 0,05$]: NET < ET ($p < 0,05$), NET < NENT ($p < 0,05$).

Grupos (ES)	Proteína (mg/g tec.)	
A x B	A	B
CNENT x CNET	230,2 ± 61.93 *	119,6 ± 16,25
CENT x CET	264,9 ± 52,19	242,7 ± 27,42
DNENT x DNET	218,5 ± 39,75 *	144,7 ± 22,16
DENT x DET	155,3 ± 16,58	136,4 ± 28,54

ANOVA + Newman-Keuls "*post-hoc*": teste [$F(1,68) = 4,06$; $p < 0,05$]; dieta vs. estimulação [$F(1,68) = 4,19$, $p < 0,05$]: CE > DE ($p < 0,05$).

Grupos (HC)	Proteína (mg/g tec.)	
A x B	A	B
CNENT x CNET	233,8 ± 46,42 **	85,19 ± 12,1
CENT x CET	236,7 ± 35,56	267,9 ± 40,4
DNENT x DNET	296,1 ± 47,16 **	144,4 ± 12,26
DENT x DET	192,9 ± 11,11	175,9 ± 21,29

ANOVA + Newman-Keuls "*post-hoc*": dieta vs. estimulação [$F(1,85) = 7,33$, $p < 0,01$]: CNE < CE ($p < 0,05$); estimulação vs. teste [$F(1,85) = 10,96$, $p < 0,001$]: NENT>NET ($p < 0,001$), ET > NET ($p < 0,01$).

No hipocampo, não houveram diferenças significativas devido à dieta ou estimulação, mas houve efeito significativo de teste [$F(1,85) = 9,07$, $p<0,01$] com os animais testados no

LCE apresentando menores níveis de proteína tecidual quando comparados com os não testados. Houve também interação significativa entre dieta e estimulação [$F(1,85) = 7,33$, $p<0,01$] com a análise *post-hoc* mostrando que a estimulação aumentou significativamente os níveis de proteína tecidual entre os bem nutridos ($p<0,05$) enquanto diminuiu entre os desnutridos ($p<0,05$). Finalmente, houve interação significativa entre estimulação e teste [$F(1,85) = 10,96$, $p<0,001$] com a análise *post-hoc* mostrando que o teste no LCE diminuiu significativamente os níveis de proteína tecidual entre os animais não estimulados ($p<0,05$) enquanto aumentou entre os estimulados ($p<0,05$).

4.5 Análise das poliaminas

As medidas das concentrações teciduais de putrescina, espermidina e espemina estão representadas nas tabelas 10 e 11. A putrescina não foi detectada no córtex frontal e estriado. No hipocampo, houve apenas efeito significante de dieta [$F(1,32) = 17,67$, $p<0,01$], com os animais desnutridos apresentando maior concentração quando comparado com os bem nutridos.

Em relação à espermidina, no córtex frontal houve efeito significativa de estimulação [$F(1,91) = 7,28$, $p<0,01$] e interação significativa entre estimulação e teste [$F(1,91) = 12,67$, $p<0,001$]. A análise *post-hoc* mostrou que enquanto o teste no LCE diminuiu a espermidina nos animais não estimulados, houve aumento nos estimulados ($p<0,05$). No estriado houve apenas interação entre estimulação e teste [$F(1,94) = 4,06$, $p<0,05$], com análise *post-hoc* mostrando que enquanto o teste no LCE aumentou a espermidina nos animais estimulados, ela diminuiu nos não estimulados ($p<0,05$). Nenhum efeito foi observado no hipocampo. Em relação à espermina, no córtex frontal houve efeito significativo do teste [$F(1,89) = 23,34$, $p<0,001$), com os animais testados apresentando valores menores quando comparados com os não testados ($p<0,05$). Houve também interação significativa entre dieta, estimulação e teste [$F(1,89) = 4,56$, $p<0,05$]. No estriado houve efeito significante de dieta [$F(1,91) = 6,77$, $p<0,05$]. Houve também significante interação entre dieta e estimulação [$F(1,91) = 14,46$, $p<0,001$] e entre dieta e teste [$F(1,91) = 7,71$, $p<0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que enquanto ambos a estimulação ambiental e o teste no LCE aumentaram os valores de espermina entre os bem nutridos, estes fatores sofreram queda nos desnutridos ($p<0,05$). No hipocampo houve efeito de teste no LCE [$F(1,93) = 7,92$; $p<0,01$], os animais testados apresentando menor valor de espermina quando comparado com os não testados ($p<0,05$). Houve também interação significativa entre dieta e estimulação [$F(1,93) = 17,33$; $p<0,001$], a estimulação ambiental aumentando os valores de espermina nos bem nutridos, enquanto produzindo decréscimo nos desnutridos ($p<0,05$).

Tabela 10- Concentrações (média ± SEM) de poliaminas putrescina (PUT), espermidina (SPD), e espermina (SPM) em nanomoles por grama de tecido no córtex frontal, estriado e hipocampo dos grupos de animais bem nutridos. A putrescina não foi detectada (n.d.) no córtex frontal e estriado

Córtex Frontal	CNENT	CNET	CENT	CET
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	280,3 ± 26,56 **	201,4 ± 22,9	296,9 ± 24,21	308,7 ± 35,16
SPM	343,8 ± 39,44 ***	159,4 ± 27,12	284,8 ± 29,84	319,3 ± 38,94
SPD+SPM	624,1 ± 61,41 ***	353,2 ± 47,17	581,7 ± 43,52	628,1 ± 73,87
SPD/SPM	0,878 ± 0,08	1,35 ± 0,19 *	1,18 ± 0,14	0,98 ± 0,02
Estriado	CNENT	CNET	CENT	CET
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	389,3 ± 46,1	385,8 ± 29,97	431,7 ± 23,59	460,4 ± 43,49
SPM	260 ± 29,7	271,9 ± 48,75	297,8 ± 22,22	362,8 ± 36,96
SPD+SPM	649,3 ± 66,71	657,8 ± 73,92	729,5 ± 34,6	823,2 ± 72,33
SPD/SPM	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,5	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Hipocampo	CNENT	CNET	CENT	CET
PUT	0,82 ± 0,17	0,63 ± 0,004	1,23 ± 0,24	1,23 ± 0,17
SPD	410 ± 48,42	401,1±41,26	489,7 ± 40,67	452 ± 59,94
SPM	319,8 ± 41,54	255,1 ± 49,11	360,4 ± 29,89	339,5 ± 35,93
SPD+SPM	729,8 ± 87,68	656,2 ± 85,17	850 ± 62,84	815,4 ± 93,95
SPD/SPM	1,35 ± 0,1	2,5 ± 0,5 *	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1

Tabela 11- Concentrações (média ± SEM) de poliaminas putrescina (PUT), espermidina (SPD), e espermina (SPM) em nanomoles por grama de tecido no córtex frontal, estriado e hipocampo dos grupos de animais desnutridos. A putrescina não foi detectada (n.d.) no córtex frontal e estriado

Córtex Frontal	DNENT	DNET	DENT	DET
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	312,4 ± 8,29 **	206,9 ± 35,57	264,4 ± 18,4	327,8 ± 18,65
SPM	368,9 ± 14,84 **	218,7 ± 31,3	267,8 ± 26,69 *	153,2 ± 16,92
SPD+SPM	681,3 ± 19,91 ***	407,3 ± 64,11	532,2 ± 41,42	481 ± 28,4
SPD/SPM	0,85 ± 0,03	0,84 ± 0,06	0,98 ± 0,07	2,34 ± 0,19 ***
Estriado	DNENT	DNET	DENT	DET
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	474,3 ± 32,72 *	316,9 ± 47,17	414,4 ± 30,4	442,4 ± 49,1
SPM	332,8 ± 20,33 *	255 ± 44,18	233,1 ± 27,74 *	129,8 ± 10,13
SPD+SPM	807,1 ± 48,36 *	571,8 ± 87,86	629,5 ± 43,17	587,8 ± 65,45
SPD/SPM	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,2	3,3 ± 0,4 ***
Hipocampo	DNENT	DNET	DENT	DET
PUT	1,40 ± 0,12	2,26 ± 0,38 *	1,36 ± 0,15	2,05 ± 0,56
SPD	522 ± 20,51 **	348,6 ± 39,07	398,7 ± 38,27	409,4 ± 40,5
SPM	406,6 ± 25,07 **	281,5 ± 37,62	234 ± 32,94 **	164,2 ± 17,06
SPD+SPM	928,6 ± 35,44 *	630 ± 74,95	632,8 ± 57,38	573,5 ± 44,92
SPD/SPM	1,3 ± 0,08	1,3 ± 0,07	1,9 ± 0,3	2,7 ± 0,3

Os dados do "pool" de espermidina e espermina [SPD+SPM] no córtex frontal mostrou efeito significativo de teste [$F(1,90) = 14,28$, $p<0,001$], com os animais testados apresentando menores valores quando comparados com os não testados. Houve também interação significativa entre dieta e estimulação [$F(1,90) = 4,48$, $p<0,05$] e entre estimulação e teste [$F(1,90) = 13,78$, $p<0,001$]. A análise *post-hoc* mostrou que enquanto a estimulação ambiental aumentou a [SPD+SPM] entre os bem nutridos, ela produziu uma diminuição nos desnutridos ($p<0,05$). A análise *post-hoc* também mostrou que enquanto o teste no LCE diminuiu a [SPD+SPM] entre os não estimulados, ela não alterou os valores entre os estimulados ($p<0,05$). Em relação aos valores de [SPD+SPM] no estriado, houveram significantes interações entre dieta e estimulação [$F(1,92) = 5,25$, $p<0,05$] e entre dieta e teste [$F(1,92) = 4,55$, $p<0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que enquanto ambos, estimulação ambiental e teste aumentaram os valores entre os bem nutridos, tais fatores diminuíram a concentração de [SPD+SPM] nos desnutridos ($p<0,05$). Os dados da [SPD+SPM] no hipocampo mostraram efeito significativo de teste [$F(1,93) = 5,39$, $p<0,05$] com os animais testados apresentando menores valores quando comparados com os não testados. Houve também interação significativa entre dieta e estimulação [$F(1,93) = 9,90$, $p<0,05$], com análise *post-hoc* evidenciando que, enquanto a estimulação aumentou a [SPD+SPM] entre os bem nutridos, tais fatores diminuíram a [SPD+SPM] entre os desnutridos ($p<0,05$).

Finalmente, os dados da razão espermidina/espermina no córtex frontal mostrou efeito significante de estimulação [$F(1,91) = 20,70$, $p<0,001$], com os animais estimulados apresentando maiores valores quando comparados com os não estimulados, e efeito significante de teste [$F(1,91) = 22,19$, $p<0,001$], com os animais testados apresentando maior valor quando comparados com os não testados. Houve também interação significante entre dieta e estimulação [$F(1,91) = 24,11$, $p<0,001$], entre dieta e teste [$F(1,91) = 9,57$, $p<0,01$] e entre estimulação e teste [$F(1,91) = 4,29$, $p<0,05$]. Finalmente, houve interação significativa entre dieta, estimulação e teste [$F(1,91) = 35,41$, $p<0,001$]. No estriado a análise da razão espermidina/espermina mostrou efeito significativo de dieta [$F(1,92) = 4,11$, $p<0,05$], com os animais bem nutridos apresentando valores menores quando comparados com os desnutridos. Houveram também significantes efeitos de estimulação [$F(1,92) = 4,54$, $p<0,05$], com os estimulados apresentando maiores valores quando comparados com os não estimulados; e efeito significativo de teste [$F(1,92) = 4,98$, $p<0,05$], com os animais testados no LCE apresentando maiores valores quando comparados com os não testados. As interações entre dieta e estimulação [$F(1,92) = 26,77$, $p<0,001$] e dieta, estimulação e teste [$F(1,92) = 12,52$, $p<0,001$] também foram significativos. Finalmente, no hipocampo, a razão

espermidina/espermina mostrou efeito significativo de teste [F(1,93) = 6,17, p<0,05], com os animais testados apresentando maiores valores quando comparados com os não testados. Houve também significantes interações entre dieta e estimulação [F(1,93) = 21,34, p<0,001] e entre dieta, estimulação e teste [F(1,93) =5,56, p<0,05].

4.6 Análise da sintase do óxido nítrico (NOS)

Os resultados das análises das sintases do óxido nítrico estão representados nas figuras 4, 5, e 6, abaixo. A análise não paramétrica de ambas, a NOS total [r=22,11; df=7;p=0,002] e a NOS constitutiva [r=20,78;df=7;p=0,004], mostrou diferença significativa entre os grupos, e o teste de Mann-Whitney para as comparações entre os 28 pares de grupos mostrou que, tanto para a NOS total (p=0,000) como para a NOS constitutiva (p=0,001), o teste, nos animais controles não estimulados, diminuiu significativamente a atividade da enzima. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada no teste de Mann-Whitney considerando p < 0,002 para as dosagens da NOS induzida, embora a elevação da atividade da NOS quando do teste aplicado nos animais desnutridos estimulados aproximou-se da significância (p=0,005), assim como a comparação entre os grupos CENT e DENT (p=0,002), com menor atividade enzimática neste último grupo.

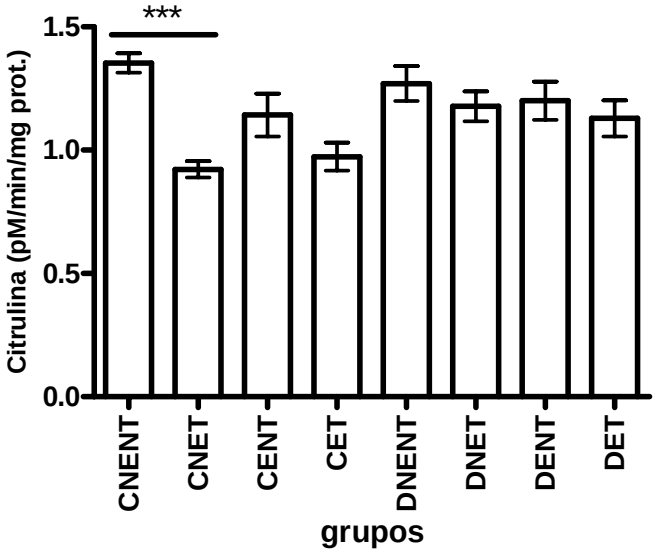

Figura 4- Atividade total das sintases do óxido nítrico no hipocampo:
Kruskal-Wallis [r=22,11;df=7;p=0,002];
Mann-Whitney: CNENT>CNET (p=0,000); CNENT>CET (p=0,001)

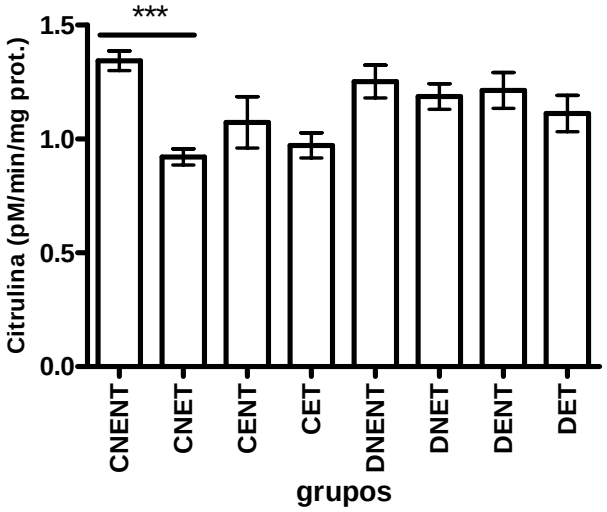

Figura 5- Atividade da NOS constitutiva do óxido nítrico no hipocampo:
Kruskal-Wallis [r=20,78; df=7;p=0,004];
Mann-Whitney: CNENT>CNET (p=0,001); CNET<DNET (p=0,001)

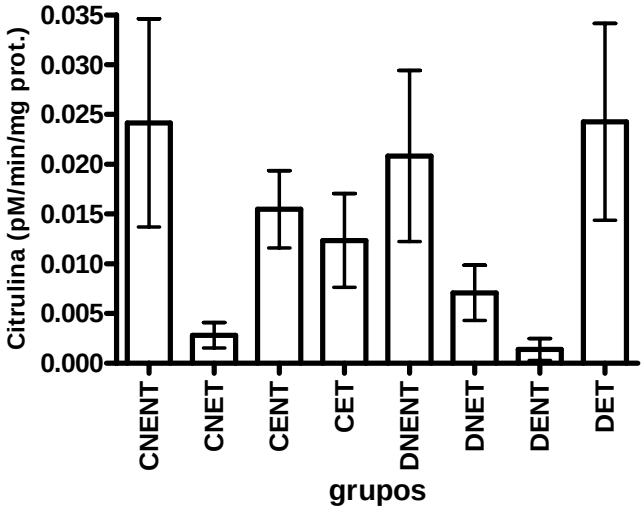

Figura 6- Atividade da NOS induzida no hipocampo:
Kruskal-Wallis: [r=15,23;df=7;p=0,033];
Mann-Whitney: CENT > DENT (p=0,002); DENT < DET (p=0,005)

4.7 Comportamento no labirinto em cruz elevado

Os dados comportamentais no LCE estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13- Categorias comportamentais analisadas. Valores representam média ± SEM. Tempo absoluto em segundos. * = efeito de dieta; † = efeito de estimulação

CATEGORIAS \ GRUPOS	CNE	DNE	CE	DE
Entradas braço aberto (%)	20,32 ± 4,96	46,3 ± 1,76 ***	28 ± 1,75	42,3 ± 3,67 ***
Tempo braço aberto (%)	10,46 ± 3,61	28,07 ± 3,34 ***	12,99 ± 1,86	24,17 ± 4,0 ***
No. entradas braço fechado	9,25 ± 1,16	8,43 ± 0,68	12,92 ± 0,74 **†	8,92 ± 0,48
Nº. head-dippings	9,5 ± 2,1	15,36 ± 2,04 *	8,75 ± 0,98	12,25 ± 2,11 *
Nº. rearing	9,83 ± 0,65 *	4,21 ± 0,55	15,75 ± 0,89 *†††	9 ± 1,0 †††
Nº. grooming	2,92 ± 0,68	4,86 ± 1,29	2,5 ± 0,48	2,83 ± 0,6
Nº. stretch-attend	10,58 ± 1,46 ***	5,36 ± 1,21	18,92 ± 1,38 ***†††	12,5 ± 2,11 †††
Tempo gasto em stretch-attend	38,61 ± 6,0 ***	7,51 ± 1,95	35,79 ± 4,2	26,24 ± 6,10 ††

A porcentagem de entradas nos braços abertos mostrou efeito significativo de dieta [$F(1,46) = 38,70$, $p<0,001$], com os desnutridos apresentando maior número de entradas quando comparados aos bem nutridos. Nenhum efeito de estimulação ou interação entre dieta e estimulação foi observado. Este resultado foi o mesmo para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, com efeito significativo apenas de dieta [$F(1,46) = 18,66$, $p<0,001$]. O número de entradas nos braços fechados mostrou efeito significativo de dieta [$F(1,46) = 9,16$, $p<0,01$], com os bem nutridos apresentando maior número de entradas quando comparados com os desnutridos. Houve também efeito significativo de estimulação [$F(1,46) = 6,80$, $p<0,05$], com os animais estimulados entrando mais nos braços fechados quando comparados com os não estimulados.

Os dados sobre o comportamento de "rearing" indicaram efeito significativo de dieta [$F(1,46) = 61,11$, $p<0,001$], com os bem nutridos mostrando maiores valores quando comparados com os desnutridos. Houve também efeito significativo de estimulação [$F(1,46) = 45,75$, $p<0,001$], com os animais estimulados apresentando maiores valores quando comparados com os não estimulados.

Quanto ao comportamento de "head-dipping", foram encontrados significativos efeitos de dieta [$F(1,46) = 6,11$, $p<0,05$], com os desnutridos apresentando maiores valores quando comparados com os bem nutridos. No comportamento de "stretch-attend" encontrou-se efeito significativo de dieta [$F(1,46) = 13,95$, $p<0,01$], com os bem nutridos apresentando maiores valores quando comparados com os desnutridos. Houve também efeito significativo de estimulação [$F(1,46) = 24,66$, $p<0,001$], com os estimulados apresentando maiores valores quando comparados com os não estimulados. Nenhuma diferença foi observada no comportamento de "grooming".

5 DISCUSSÃO

Sob as condições cromatográficas de extração das poliaminas dos tecidos, utilizadas conforme descrito por Löser, Wunderlich e Fölsch (1988), a putrescina não foi detectada por estar sua concentração abaixo dos níveis de detecção do método por nós reproduzido. As medidas tomadas para a concentração das amostras elevaram a massa final de tecido injetada no HPLC de 5 vezes, o que tornou a putrescina detectável e quantificável nas amostras. As diferentes propriedades das fases estacionárias das colunas utilizadas neste estudo (LiChrospher®) e por Löser, Wunderlich e Fölsch (1988) (NovaPak®) tais como: diferenças no tamanho da partícula, no tamanho de poro, na área de superfície, na carga de carbono, maior exposição de grupos silanóis, com conseqüentes maior hidrofobicidade e maior polaridade, podem explicar diferenças na eficiência para compostos básicos entre as colunas (COMPARISON..., 2006). Gennaro, Angelino e Gianotti (1999), em estudo sobre a adequação de diferentes colunas cromatográficas com fases estacionárias C18 para a transferência de métodos de interação iônica no HPLC, comparando a robustez na transferência de método entre 5 diferentes marcas comerciais, com fases estacionárias baseadas em sílica (RP-18) de 5 μm, concluíram que o parâmetro crítico a ser considerado na troca de colunas entre métodos é o pH da fase móvel, que deve ser estritamente controlado para manutenção da performance. Com a coluna LiChrospher®, desvios mínimos de até ± 2,5% no pH da fase móvel são tolerados (GENNARO; ANGELINO; GIANOTTI, 1999), o que procuramos observar. Löser et al. (1999) relata o uso da diluição final de 01:10 para a concentração de amostras.

A concentração das poliaminas nos tecidos pode ser expressa em nanomoles por grama de tecido e a normalização em miligramas de proteina fornece resultados similares como também verificado por Deignan et al. (2007).

Assim como observado por Crnic (1983), o peso dos animais bem nutridos não estimulados foi maior que os estimulados, o que poderia ser explicado pela maior concentração de CORT nestes animais, como visto nos resultados.

Os dados mostrados aqui descrevem ainda os efeitos da desnutrição protéica e estimulação ambiental sobre o comportamento de ansiedade e a atividade do eixo HPA após exposição do rato ao LCE. Os animais desnutridos apresentaram nível de CORT basal elevado quando comparados aos bem nutridos e responderam com aumento dos níveis de glicocorticóide circulante após exposição ao LCE, como previamente descrito (FILE et al., 1994; JACOBSON; ZURAKOWSKI; MAJZOUB et al., 1997; RODGERS et al., 1999;

SOBOTKA; COOK; BRODIE, 1974). Este resultado confirma que a desnutrição protéica é um estímulo crônico sobre a atividade do eixo HPA que preserva a responsividade a outros estressores ao mesmo tempo em que eleva os níveis basais de glicocorticóides. A estimulação ambiental repetitiva, agindo como evento estressor brando, pode estar contribuindo para a elevação dos níveis basais de CORT nos bem nutridos. De acordo com Dallman et al. (1987), a concentração basal de CORT é menor que 1 μg/dL em ratos mantidos sem perturbação ambiental com livre acesso a água e alimento. A deprivação de água por 12 ou mais horas pode elevar a CORT plasmática a valores entre 5 e 9 μg/dL (DALLMAN et al., 1987). Esta elevação pode resultar em aumento da atividade central, resultando em elevação da secreção de CRF e ACTH durante o ciclo normal da função adrenocortical. Interessante o fato de que animais submetidos à estimulação ambiental não apresentaram elevados níveis de CORT plasmática após exposição ao LCE, quando comparados aos animais não estimulados, podendo sugerir que a estimulação crônica ambiental desde o início da vida (FENOGLIO et al., 2004) leva a adaptações no eixo HPA, que podem incluir a resposta mais rápida ou menos prolongada da secreção de CORT (HESS et al., 1969; JUTAPAKDEEGUL et al., 2003; PLOTSKY; MEANEY, 1993) e catecolaminas (MEERLO et al., 1999) após a exposição a um estressor agudo. Este fato pode ser devido à maior sensibilidade do eixo HPA à retroalimentação negativa, relacionada à maior expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal (JUTAPAKDEEGUL et al., 2003). Assim, a elevação dos níveis de CORT plasmática, como resultado da exposição ao LCE, é de menor magnitude ou apresentou pico mais cedo em ambas as condições de dieta nos animais submetidos à estimulação. Os valores menores de proteína plasmática total nos desnutridos quando comparados com os bem nutridos podem sugerir uma maior fração livre de CORT circulante.

Gelfand et al. (1984) reportaram que a elevação prolongada de glicocorticoides, epinefrina e norepinefrina em situações de estresse severo, podem contribuir para a perda massiva de nitrogênio, proteólise muscular e hiper-metabolismo. Wronska et al. (1990) descreveram que a supressão da elevação de hormônios catabólicos induzida pelo estresse, em animais submetidos a deprivação alimentar, contribui para o decréscimo das taxas metabólicas e preservação de proteína corporal. O presente estudo descreve a diminuição dos níveis de proteína tissular no córtex frontal, estriado e hipocampo, trinta minutos após o teste no LCE em animais não estimulados em ambas as condições de dieta, um efeito não observado em animais previamente submetidos à estimulação ambiental. Um melhor “coping” em situações de estresse, que pode estar sendo refletido por uma mais curta, menos prolongada, elevação da CORT plasmática após exposição ao LCE, pode estar contribuindo

para a ausência de proteólise na mesma magnitude como a observada em animais não estimulados, sendo a observação da degradação protéica apropriada para a quantificação do estresse oxidativo (PACIFICI; DAVIES, 1990). É também possível que, após a exposição ao LCE, a secreção reativa de catecolaminas seja menos intensa ou mais curta (LUCION et al., 2003), como também descrito por Konarska, Stewart e McCarty (1989) após exposição a estresse crônico intermitente. No presente estudo, a concentração de proteína plasmática total também foi menor após teste no LCE entre os bem nutridos não estimulados.

À ativação transitória do metabolismo das poliaminas no cérebro sob influência dos glicocorticoides, Gilad et al. (2001) referem-se à resposta das poliaminas ao estresse (PSR). A PSR pode ser considerada como um mecanismo bioquímico celular específico, demonstrando a capacidade do cérebro em controlar a homeostáse das poliaminas sob situações de estresse única ou repetidamente apresentadas. Neste trabalho, a reação do metabolismo das poliaminas à exposição ao LCE foi observada, caracterizando-se pelo decréscimo das concentrações de espermidina e espermina, e do "pool" de [SPD+SPM] no córtex frontal entre os bem nutridos não estimulados, e no córtex frontal, estriado e hipocampo, entre os desnutridos não estimulados. Nenhuma diferença foi observada nos níveis de espermidina e espermina nas três estruturas nos animais em ambas as condições de dieta em condições basais (sem estimulação e sem teste no LCE), sugerindo a plasticidade dos organismos desnutridos na manutenção da homeostase das poliaminas. A elevação da CORT plasmática, queda da concentração protéica tecidual e ativação do catabolismo das poliaminas em grupos de animais sob condições experimentais similares, principalmente no córtex frontal e hipocampo, sugerem a interação destes fatores na PSR observada. Assim, ao nível celular, a elevação da CORT induz o catabolismo das poliaminas, após ativação da SSAT, com queda na proteína tecidual pelo estresse oxidativo, com, possivelmente, maior quantidade de poliaminas livres no citoplasma, seguido de efluxo de N1-acetilespermidina e N1-acetilespermina para o meio extracelular e consequente diminuição do "pool" de [SPD+SPM] e, principalmente, espermina com ocorrência ou não de variação na razão espermidina/espermina ([SPD/SPM]). A PSR alterada nos animais previamente submetidos à estimulação ambiental seria explicada pelo diferente "coping" do eixo HPA em diferentes condições de estresse, como descrito acima, a PSR refletindo as mudanças na concentração plasmática de CORT nestes grupos. A razão [SPD/SPM] tem sido utilizada como marcador mais confiável da formação de espermidina a partir da espermina durante o ciclo de inter-conversão das poliaminas (SEILER; BOLKENIUS, 1985). Hixson et al. (1994) relataram que a razão [SPD/SPM] é o indicador menos susceptível a erros de medida pois não depende de uma segunda medida

para normalização, como o peso ou o conteúdo de proteína das amostras. É interessante o fato de que os animais desnutridos estimulados, mesmo sem significante alteração dos níveis de CORT plasmática e da proteína tecidual trinta minutos após exposição ao LCE, os quais provavelmente voltaram aos seus níveis próximos do controle mais rapidamente do que nos não estimulados, mostrarem ativação do metabolismo das poliaminas, com elevação da razão [SPD/SPM] no córtex frontal e estriado, mas não no hipocampo, que se mostra como estrutura mais plástica com queda da espermina e preservação do conteúdo de espermidina.

Wu et al. (1999) relata que a desnutrição protéica (5% de caseína) reduziu as atividades da NOS constitutiva e induzida no cérebro, coração, jejuno, pulmão, músculo esquelético e baço. Radomski, Palmer e Moncada (1990) relatam que os glicocorticóides inibem a expressão da NOS induzida e que esta inibição pode explicar a ação anti-inflamatória destes esteróides. Em relação à análise da NOS no hipocampo, observamos a queda significativa da atividade da NOS total e da NOS constitutiva após a aplicação do teste no LCE apenas nos animais bem nutridos não estimulados. Possivelmente, aos trinta minutos após o teste no LCE, a queda atividade da NOS total e constitutiva já não são mensuráveis nos animais previamente estimulados tendo havido tal queda em menor intensidade ou se recuperado para níveis dos controles previamente aos trinta minutos, em paralelo ao comportamento das concentrações de CORT circulantes acima observados. A queda significativa da atividade da NOS indica que houve menor produção de citrulina marcada a partir da arginina marcada na amostra de hipocampo analisada no animal testado, o que parece indicar que o teste no LCE leva ao aumento do metabolismo do óxido nítrico e que a NOS foi consumida. Dados metabólicos mais detalhados necessitariam mais experimentos, como medir a produção de NO em células de hipocampo controle e testadas cultivadas em meio apropriado. Situações com maior exposição a radicais oxidantes, ou capacidade antioxidante comprometida, como na queda do "pool" total de poliaminas, conhecidas antioxidantes (HA et al., 1998; WALLACE, 2000), contribuem para o estresse oxidativo ao nível celular (PACIFICI; DAVIES, 1990), fato aparentemente não observado na mesma extensão nos animais estimulados. A inibição aguda da síntese de óxido nítrico em ratos induz ansiólise no teste no LCE em animais tratados sistemicamente com L-NAME, um inibidor da sintase do óxido nítrico (FARIA et al., 1997). A administração de doadores de óxido nítrico resulta na supressão da captação de poliaminas, sendo a modulação do transporte de poliaminas um processo gradual, mais lento do que a desativação da ODC e outras proteínas por nitrosilação (SATRIANO et al., 1999), provavelmente esta sendo a principal ação do óxido nítrico contribuindo para a diminuição do "pool" de poliaminas intracelulares após o

teste no LCE. Interessante a observação de baixos níveis de iNOS nos animais desnutridos estimulados e sua tendência a elevação após o teste no LCE (p=0,005), possivelmente mostrando efeito de sua reposição (“turnover”), com aumentada atividade na produção de óxido nítrico trinta minutos após o teste no LCE no material analisado.

O tempo gasto nos braços abertos do LCE e a porcentagem de entradas nos braços abertos são índices de ansiedade, enquanto o número total de entradas nos braços fechados refletem atividade locomotora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Em relação às análises comportamentais no LCE, como já descrito (MOREIRA et al., 1997), a desnutrição protéica resultou em maior exploração dos braços abertos indicando menor ansiedade e/ou maior impulsividade. Além disso, foi observado maior número de comportamentos de “head-dippings” e menor número de comportamentos de “stretch-attend”, indicando déficits em comportamentos de avaliação de risco nos animais desnutridos.

6 CONCLUSÃO

O método cromatográfico altamente sensível e reprodutivo desenvolvido por Löser, Wunderlich e Fölsch (1988), utilizado neste trabalho, assim como em outros (LÖSER et al., 1999; TIBERIO; MAIER; SCHIAFFONATI, 2001; WALTERS et al., 1995), mostrou-se adequado à proposta de análise das poliaminas.

A desnutrição protéica elevou o nível de CORT circulante e diminuiu o conteúdo de proteína plasmática, além de resultar em alterações ponderais marcantes.

O teste no LCE elevou a CORT circulante, proporcionou proteólise tecidual e diminuiu o "pool" de poliaminas nas estruturas cerebrais estudadas nos animais, sendo que nos não estimulados isto foi detectado aos 30 minutos após o teste. Provavelmente, nos animais estimulados tais alterações ocorreram previamente ou em menor escala.

A estimulação ambiental reduziu a ansiedade avaliada no teste do LCE, tanto nos bem nutridos como nos desnutridos.

Em conclusão, a estimulação ambiental pode ser considerada importante agente antioxidante.

REFERÊNCIAS

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F.; SAILOR, K.; DEMPSEY, R. J. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 938, p. 81-86, 2002.

AHMAD, C.; RAHMAN, M. A. Effects of undernutrition and protein malnutrition on brain chemistry of rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 105, p. 1090-1103, 1975.

ALMEIDA, S. S.; GARCIA, R. A.; CIBIEN, M. M. R.; DE ARAUJO, M.; MOREIRA, G. M. S.; DE OLIVEIRA, L. M. The ontogeny of exploratory behaviors in early-protein-malnourished rats exposed to the elevated plus-maze test. **Psychobiology**, Austin, v. 22, n. 4, p. 283-288, 1994.

BIAGINI, G.; PICH, E. M.; CARANI, C.; MARRAMA, P.; AGNATI, L. F. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 16, n. 3/4, p. 187-197, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 86, n. 22, p. 9030-9033, 1989.

CHILDS, A. C.; MEHTA, D. J.; GERNER, E. W. Polyamine-dependent gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, p. 1394-1406, 2003.

COMPARISON guide to c18 reversed phase hplc columns. London: ACE, 2006. Disponível em: <http://www.ace-hplc.com/assets/downloads/ACE_comparison_guide_2006.pdf>. Acesso em: 23 maio 2009.

CRNIC, L. S. Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior. **Developmental Psychobiology**, New York, v. 16, n. 2, p. 129-145, 1983.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, Tarrytown, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

CUI, Q.; SO, K. Involvement of cAMP in neuronal survival and axonal regeneration. **Anatomical Science International**, Carlton, v. 79, p. 209-212, 2004.

DÁGOSTINHO, J.; HENNING, S. J. Role of thyroxine in coordinate control of corticosterone and CBG in postnatal development. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism,** Bethesda, v. 242, p. E33-E39, 1982.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; CASCIO, C. S.; DARLINGTON, D. N.; JACOBSON, L.; LEVIN, N. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 43, p. 113-173, 1987.

DE KLOET, E. R.; OITLZ, M. S.; JOËLS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 22, p. 422-426, 1999.

DEIGNAN, J. L.; LIVESAY, J. C.; SHANTZ, L. M.; PEGG, A. E.; O'BRIEN, W. E.; IYER, R. K.; CEDERBAUM, S. D.; GRODY, W. W. Polyamine homeostasis in arginase knockout mice. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 293, p. C1296-C1301, 2007.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F. Induction of brain ornithine decarboxylase during recovery from metabolic, mechanical, thermal, or chemical injury. **Journal of Neurochemistry,** Oxford, v. 42, p. 1053-1061, 1984.

ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, P. C.; MOREIRA, A. C. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 82, p. 1243-1247, 1997.

ELIAS, P. C.; ELIAS, L. L.; CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 180, p. 297-302, 2004.

EVANS, G. W. The environment of childhood poverty. **American Psychologist**, Washington, DC, v. 59, n. 2, p. 77-92, 2004.

FARIA, M.; MUSCARÁ, M. N.; MORENO, J., Jr.; TEIXEIRA, S. A.; DIAS, H. B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 323, p. 37-43, 1997.

FENOGLIO, K. A.; BRUNSON, K. L.; AVISHAI-ELINER, S.; CHEN, Y.; BARAM, T. Z. Region-specific onset of handling-induced changes in corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor expression**. Endocrinology**, Chevy Chase, v. 145, n. 6, p. 2702-2706, 2004.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, J. R. H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 113, p. 543-546, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Brazil**: the hunger of the missed meal. Rome, 2003. Interview with Andrew MacMillan . Disponível em: <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2003/13320-en.html>. Acesso em: 23 maio 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The spectrum of malnutrition**. 2001. Disponível em: <www.fao.org/worldfoodsummit/english/ fsheets/malnutrition.pdf>. Acesso em: 23 maio 2009.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 60-67, 1991.

GELFAND, R. A.; MATTHEWS, D. E.; BIER, D. M.; SHERWIN, R. S. Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 74, p. 2238-2248, 1984.

GENNARO, M. C.; ANGELINO, S.; GIANOTTI, V. Suitability of different C18 silica-based stationary phases for the transferability of an ion-interaction HPLC method. **Analysis**, Oxford, v. 27, p. 742-748, 1999.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H. Overview of the brain polyamine-stress-response: regulation, development, and modulation by lithium and role in cell survival. **Cellular and Molecular Neurobiology,** New York, v. 23, n. 4-5, p. 637-649, 2003.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H.; ELIYAYEV, Y.; RABEY, J. M. Developmental regulation of the brain polyamine-stress-response. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 16, n. 3/4, p. 271-278, 1998.

GILAD, V. H.; RABEY, J. M.; ELIYAYEV, Y. Different effects of acute neonatal stressors and long-term postnatal handling on stress-induced changes in behavior and in ornithine decarboxylase activity of adult rats. **Brain Research**. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 120, p. 255-259, 2000.

GILAD, V. H.; RABEY, J. M.; KIMIAGAR, Y.; GILAD, G. M. The polyamine stress response: tissue-, endocrine-, and developmental-dependent regulation. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 61, p .207-213, 2001.

GROFF, J. L.; GROPPER, S. S. Perspective: protein turnover: starvation versus "stress". In: _____. **Advanced nutrition and human metabolism**. 3rd ed. Belmont: Wadsworth/Thomson Learning, 2000. p. 216-219.

GUILLEMIN, R.; DEAR, W. E.; LIEBELT, R. A. Nychthemeral variations in plasma free corticosteroid levels of the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 101, p. 394-395, 1959.

HA, H. C.; SIRISOMA, N. S.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J. L.; WOSTER, P. M.; CASERO, R. A., Jr. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 95, p. 11140-11145, 1998.

HALLINE, A. G.; DUDEJA, P. K.; BRASITUS, T. A. 1,2-Dimethylhydrazine-induced alterations in N1-acetylspermidine levels and spermidine N1-acetyltransferase acivity in rat colonic mucosa. **Cancer Research**, Baltimore, v. 49, p. 633-638, 1989.

HESS, J. L.; DENENBERG, V. H.; ZARROW, M. X.; PFEIFER, W. D. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. **Physiology and Behavior**, New York, v. 4, p. 109-111, 1969.

HIXSON, L. J.; EMERSON, S. S.; SHASSETZ, R.; GERNER, E. W. Sources of variability in estimating ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in human colorectal mucosa. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 3, p. 317- 323, 1994.

HOBBS, C. A.; PAUL, B. A.; GILMOUR, S. K. Deregulation of polyamine biosynthesis alters intrinsic histone acetyltransferase and deacetylase activities in murine skin and tumors. **Cancer Research**, Baltimore, v. 62, p. 67-74, 2002.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2(R1): ICH harmonised tripartite guideline. Nov. 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 23 maio 2009.

JACOBOWITZ, D. M. Removal of discrete fresh regions of the rat brain. **Brain Research**, Amsterdam, v. 80, p. 111-115, 1974.

JACOBSON, L.; ZURAKOWSKI, D.; MAJZOUB, J. A. Protein malnutrition increases plasma adrenocorticotropin and anterior pituitary proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the rat. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 138, p. 1048-1057, 1997.

JÄNNE, J.; RAINA, A.; SIIMES, M. Spermidine and spermine in rat tissues at different ages. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 62, p. 352-358, 1964.

JUTAPAKDEEGUL, N.; CASALOTTI, S. O.; GOVITRAPONG, P.; KOTCHABHAKDI, N. Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels and glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. **Developmental Neuroscience**, Basel, v. 25, n. 1, p. 26-33, 2003.

KISS, J. P.; VIZI, E. S. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 211-215, 2001.

KONARSKA, M.; STEWART, R. E.; MCCARTY, R. Habituation of sympathetic adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. **Physiology and Behavior**, New York, v. 45, p. 255-261, 1989.

LADD, C. O.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 137, n. 4, p. 1212-1218, 1996.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. E. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, p. 2221S-2232S, 1995.

LIMA, J. G.; DE OLIVEIRA, L. M.; LACHAT, J. J.; DAL-BO, C. M. R.; ALMEIDA, S. S. Comparision of the effects of lab chow and casein diets based on body and brain development of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 1069-1076, 1993.

LISTER, J. P.; BLATT, G. J.; DEBASSIO, W. A.; KEMPER, T. L.; TONKISS, J.; GALLER, J. R.; ROSENE, D. L. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. **Hippocampus**, New York, v. 15, p. 393-403, 2005.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, New York, v. 3, n. 8, p. 799-806, 2000.

LÖSER, C.; WUNDERLICH, U.; FÖLSCH, U. R. Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous fluorimetric detection of polyamines and theirs monoacetyl derivatives in human and animal urine, serum and tissue samples: an improved, rapid and sensitive method for routine application. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 430, p. 249-262, 1988.

LÖSER, C.; EISEL, A.; HARMS, D.; FÖLSCH, U. R. Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. **Gut**, London, v. 44, p. 12-16, 1999.

LU, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. **Learning & Memory**, Cold Spring Harbor, v. 10, p. 86-98, 2003.

LUCION, A. B.; PEREIRA, F. M.; WINKELMAN, E. C.; SANVITTO, G. L. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. **Behavioral Neuroscience**, Washington, DC, v. 117, p. 894-903, 2003.

MALATERRE, J.; STRAMBI, C.; AOUANE, A.; STRAMBI, A.; ROUGON, G.; CAYRE, M. A novel role for polyamines in adult neurogenesis in rodent brain. **European Journal of Neuroscience**, Paris, v. 20, p. 317-330, 2004.

MEERLO, P.; HORVATH, K. M.; NAGY, G. M.; BOHUS, B.; KOOLHASS, J. M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 11, p. 925-933, 1999.

MESQUITA, R. M.; PEREIRA, P. A.; ANDRADE, J. P. Low levels of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B are related to loss of dentate granule cells after prolonged low-protein feeding in the rat. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 330, n. 2, p. 155-158, 2002.

MIRESCU, C.; PETERS, J. D.; GOULD, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. **Nature Neuroscience**, New York, v. 7, n. 8, p. 841-846, 2004.

MOREIRA, G. M. S.; DE ARAUJO, M.; DE OLIVEIRA, L. M.; ALMEIDA, S. S. The behavior of protein-calorie-malnourished rats on the elevated plus-maze test: an ethopharmacological analysis. **Psychobiology**, Austin, v. 25, p. 180-185, 1997.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 26, p. 471-483, 2002.

O´SHEA, R. D.; GUNDLACH, A. L. Food or water deprivation modulate nitric oxide synthase (NOS) activity and gene expression in rat hypothalamic neurones: correlation with neurosecretory activity? **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 8, p. 417-425, 1996.

PACIFICI, R. E.; DAVIES, K. J. A. Protein degradation as an index of oxidative stress. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 485-502, 1990.

PEGG, A. E. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. **Cancer Research**, Baltimore, v. 48, p. 759-774, 1988.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 9-11, 2003.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, p. 149-167, 1985.

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress induced release in adult rats. **Brain Research Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 18, p. 195-200, 1993.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 64, p. 51-68, 2001.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 87, pp. 10043-10047, 1990.

RAMOS, C. F.; LIMA, A. P. S.; TEIXEIRA, C. V.; BRITO, P. D.; MOURA, E. G. Thyroid function in post-weaning rats whose dams were fed a low-protein diet during suckling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 133-137, 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 23, p. 1939-1951, 1993.

ROCAMORA, N.; WELKER, E.; PASCUAL, M.; SORIANO, E. Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation. **Journal of Neuroscience**, Washington, DC, v. 16, n. 14, p. 4411-4419, 1996.

ROCINHOLI, L. F.; ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L. M. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 407-413, 1997.

ROCINHOLI, L. F.; DE OLIVEIRA, L. M.; COLAFÊMINA, J. F. Malnutrition and environmental stimulation in rats: interpeak intervals of the brainstem auditory evoked potentials. **Nutritional Neuroscience**, London, v. 4, p. 189-198, 2001.

RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, New York, v. 68, p. 47-53, 1999.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNET, E. L.; DIAMOND, M. C. Brain changes in response to experience. **Scientific American**, New York, v. 226, n. 2, p. 22-29, 1972.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 11, p. 65-76, 1986.

SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. **Amino Acids**, Wien, v. 26, p. 321-329, 2004.

SATRIANO, J.; ISHIZUKA, S.; ARCHER, D. C.; BLANTZ, R. C.; KELLY, A. C. J. Regulation of intracellular polyamine biosynthesis and transport by NO and cytokines TNF-alpha and IFN-gamma. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 276 n. 45, p. C892-C899, 1999.

SCHANBERG, S. M.; BUTLER, S. R.; SUSKIND, M. R. Maternal behavior as a regulator of polyamine biosynthesis in brain and heart of the developing rat pup. **Science**, Washington, DC, v. 99, p. 445-447, 1978.

SCHMIDT, M.; LEVINE, S.; OITZL, M. S.; VAN DER MARK, M.; MÜLLER, M. B.; HOLSBOER, F.; DE KLOET, E. R. Glucorcorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 146, n. 3, p. 1458-1464, 2005.

SEILER, N.; BOLKENIUS, F. Polyamine reutilization and turnover in brain. **Neurochemical Research**, New York, v. 10, p. 529-544, 1985.

SHASKAN, E. G.; HARASZTI, J. H.; SNYDER, S. H. Polyamines: developmental alterations in regional disposition and metabolism in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 20, p. 1443-1452, 1973.

SHESKIN, D. J. **Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures**, 3rd ed. Florida: Ed. Chapman & Hall/CRC, 2004.

SHOEMAKER, W. J.; BLOOM, F. E. Effect of undernutrition on brain morphology. In: WURTMAN, R. J.; WURTMAN, J. J. (Eds.). **Nutrition and the brain.** New York: Raven Press, 1977. v. 2, p. 147-192.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Completing the method: validation and transfer. In: _____. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 687-713.

SOBOTKA, T. J.; COOK, M. P.; BRODIE, R. E. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestation. **Brain Research**, Amsterdam, v. 65, p. 443-457, 1974.

STANTON, M. E.; GUTIERREZ, Y. R.; LEVINE, S. Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. **Behavioral Neuroscience**, Washington, DC, v. 102, n. 5, p. 692-700, 1988.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 749-790, 1984.

TIBERIO, L.; MAIER, J. A. M.; SCHIAFFONATI, L. Down-regulation of c-myc expression by phorbol ester protects CEM T leukaemia cells from starvation-induced apoptosis: role of ornithine decarboxylase and polyamines. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 8, p. 967-976, 2001.

TORUN, B.; CHEW, F. Protein-energy malnutrition. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, C. (Eds.). **Modern nutrition in health and disease.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 963-988.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry**: bioanalytical methods validation for human studies. Rockville, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>. Acesso em: 23 maio 2009.

VAID, R. R.; YEE, B. K.; SHALEV, U.; RAWLINS, J. N. P.; WEINER, I.; FELDON, J.; TOTTERDELL, S. Neonatal nonhandling and in utero prenatal stress reduce the density of NADPH-diaphorase-reactive neurons in the fascia dentata and Ammon´s Horn of rats. **Journal of Neuroscience**, Washington, DC, v. 17, n. 14, p. 5599-5609, 1997.

WALLACE, H. M. The physiological role of the polyamines. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 30, p. 1-3, 2000.

WALTERS, J. D.; ANTHONY, C. C.; LEBLEBICIOGLU, B.; FERNANDEZ, M. C.; MARUCH, P, T. An inhibitor of polyamine biosynthesis impairs human polymorphonuclear leukocyte priming by tumor necrosis factor alpha. **Journal of Leukocyte Biology,** New York, v. 57, p. 282-286, 1995.

WEST, A. R.; GRACE, A. A. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. **Journal of Neurophysiology**, Bethesda, v. 83, p. 1796-1808, 2000.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal,** v. 325, p. 286-297, 1997.

WRONSKA, D.; NIEZGODA, J.; SECHMAN, A.; BOBEK, S. Food deprivation supresses stress-induced rise in catabolic hormones with a concomitant tendency to potentiate the increment of blood glucose. **Physiology & Behavior**, New York, v. 48, p. 531-537, 1990.

WU, G.; FLYNN, N. E.; FLYNN, S. P.; JOLLY, C. A.; DAVIS, P. K. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. **Journal of Nutrition,** Bethesda, v. 129, p. 1347-1354, 1999.

Anexo – Artigo publicado

PSYCHOLOGY & NEUROSCIENCE

Psychology & Neuroscience, 2008, 1, 1, 108-118
DOI: 10.3922/j.psns.2008.2.004

The effects of early protein malnutrition and environmental stimulation on behavioral and biochemical parameters in rats

Valdomiro de Freitas Sampaio, Luiz Marcellino de Oliveira †, Sebastião Sousa Almeida, Julio Sérgio Marchini, José Antunes-Rodrigues and Lucila Leico Kagohara Elias

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

† *in memoriam*

Abstract

The present study investigated the effects of protein malnutrition and environmental stimulation on biochemical and behavioral parameters in rats. The concentrations of polyamines in the frontal cortex, striatum, and hippocampus, as well as plasma corticosterone levels, were measured. The exploratory behavior was analyzed using the elevated plus-maze (EPM) test. Rats received either 16% (well-nourished - W) or 6% (malnourished - M) protein diets and were divided into stimulated or non-stimulated groups. Malnutrition increased corticosterone levels and decreased plasma protein and anxiety. Non-stimulated rats tested in the EPM had increased corticosterone levels and decreased frontal cortex, striatum and hippocampus protein and polyamines contents. Stimulation decreased open arm entries in the EPM in M animals and increased closed arm entries in the W ones. Stimulation increased frequency and time spent in risk-assessment behaviors. These results suggest that both malnutrition and EPM testing are distressing situations, as indicated by increased corticosterone levels. These results are consistent with lower anxiety and/or higher impulsiveness in M animals. **Keywords**: malnutrition, polyamines, corticosterone, elevated plus-maze, anxiety.

Received 31 October 2008; received in revised form 13 December 2008; accepted 16 December 2008. Available online 29 December 2008.

Introduction

Malnutrition is a worldwide problem that affects millions of newborns and children during the most vulnerable stages of cerebral development, impairing several maturational events and leading to morphological, neurochemical, behavioral, and cognitive alterations (Levitsky & Strupp, 1995; Morgane, Mokler, & Galler, 2002). Experimental studies in animals indicate that both malnutrition and sensory deprivation affect learning and memory. On the other hand, the appropriate dietary restoration and environmental stimulation can help to prevent and/or partially reduce these effects (Schanberg, Butler, & Suskind, 1978).

Valdomiro F. Sampaio, Luiz M. de Oliveira and Sebastião S. Almeida – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, Brazil. Júlio S. Marchini, José Antunes-Rodrigues and Lucila L.L. K. Elias – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, Brazil. Correspondence regarding this article should be directed to: Valdomiro F. Sampaio – Laboratório de Nutrição e Comportamento do Departamento de Psicologia e Educação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Avenida dos Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo, Brazil, 14040-901. E-mail: valdomirosampaio@yahoo.com.br

Prolonged protein malnutrition in the rat leads to decreased 5-HT1$_A$ serotonin receptor expression and decreased neurogenesis in the central nervous system (Mirescu, Peters, & Gould, 2004), hippocampal atrophy (Lister et al., 2005) and decreased glucocorticoid receptor density in the hippocampus (de Kloet, Oitlz, & Joëls, 1999), with consequent changes in the negative feedback regulation of corticosterone (CORT) upon the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and maintained elevation of plasma adrenocorticotropin and CORT levels (Jacobson, Zurakowski, & Majzoub, 1997). Malnutrition also contributes to hypothyroidism (Ramos, Lima, Teixeira, Brito, & Moura, 1997), low levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Mesquita, Pereira, & Andrade, 2002) and decreased activity of ornithine decarboxylase (ODC) (Schertel & Eichler, 1991), a regulatory, limiting of polyamine synthesis enzyme and a marker of cellular proliferation and differentiation (Pegg, 1988; Tabor & Tabor, 1984).

The polyamine metabolism complexity and the variety of compensatory mechanisms involved in the maintenance of its homeostasis support their critical role in cellular survival. Historically the ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17) and the spermidine/spermine-N^1-acetyltransferase enzymes (SSAT; EC 2.3.1.57) have been considered as regulators of biosynthesis and catabolism of polyamines, respectively. ODC is a highly inducible

cytosolic enzyme that responds to trophic stimuli, with a half-life lasting from 10 minutes to one hour. ODC is subject to positive and negative feedback regulation by polyamines: polyamine high concentration decreases while polyamine low concentration increases the enzyme activity. This regulation is under the influence of antizyme induction - an ODC specific inhibitor (Hayashi & Murakami, 1995) with a half-life shorter than 30 minutes - as the result of the intracellular increase of polyamines (Pegg, 2006). Both spermine and spermidine are substrata for and inductors of SSAT, with spermidine being approximately three times more efficient as substratum than spermine (Wallace, Fraser, & Hughes, 2003). SSAT has a half-life lasting from 20 to 40 minutes and is quickly inducible. Ientile, De Luca, Di Giorgio and Macaione (1988) reported the ODC and SSAT induction in the hippocampus and cerebellum by CORT, with striking increase of putrescine and a small decrease in spermidine concentration, probably due to the N^1-acetylspermidine slow cleavage by polyamine oxidase (PAO). According to Ientile et al. (1988), the synthesis of the ODC enzyme would be the inducing mechanism (peak of induction around six hours after glucocorticoid administration), even though the short latency period for its onset suggests alternative mechanisms. The action of agmatine, produced by arginine decarboxylase with its inductive action upon antizyme (Dudkowska et al., 2003), the nitric oxide inhibition upon ODC activity (Satriano, Ishizuka, Archer, Blantz, & Kelly, 1999), and the polyamine influx from the extracellular space may all be involved in these fast alternative mechanisms. Polyamine transportation into the cell and the N^1-acetylspermidine, spermidine and putrescine exportation contributes to the polyamine homeostasis, spermine not being exported by the cell (Seiler, 2004). Only the free fraction of polyamines, about 10% of the intracellular amount (Igarashi & Kashiwagi, 2000), is catabolized and excreted by mammal cells (Hyvönen, 1989). Fogel-Petrovic, Vujcic, Miller and Porter (1996) reported that, despite the fact that the intracellular concentration of polyamines is in the millimolar range and that there is SSAT mRNA in excess, the translation is not activated unless there is a cellular polyamine influx. The polyamine influx seems to be controlled by intracellular concentrations of polyamines (Shappell, Fogel-Petrovic, & Porter, 1993).

There are several behavioral consequences of malnutrition, and some authors have shown that malnutrition leads to reduced environmental exploration, increased locomotor activity, and low thresholds to aversive stimuli (shocks, intense light, cold water), characterizing an intensified emotional reaction (Almeida et al., 1994; Moreira, de Araujo, de Oliveira, & Almeida, 1997; Rocinholi, Almeida, & de Oliveira, 1997). Increases in the number of entries and in the time spent on the open arms of the elevated plus-maze suggest that the low protein diet causes a permanent increase in impulsiveness and/or a greater tendency to explore the open arm novelty, an indicative of lower anxiety (Almeida et al., 1994).

The use of environmental stimulation was shown to be a useful technique to reduce the impairments produced by early malnutrition or by environmental isolation (Rosenzweig, Bennet, & Diamond, 1972). Environmental stimulation increases glucocorticoid receptor expression in the hippocampus and frontal cortex of rats (Jutapakdeegul, Casalotti, Govitrapong, & Kotchabhakdi, 2003), changing the regulation of the hypothalamic synthesis of the corticotrophin-releasing factor (CRF) and the HPA axis reactivity to stress (Ladd, Owens, & Nemeroff, 1996).

Thus, the main objective of the present work was to study the biochemical alterations in polyamine (putrescine, spermidine, and spermine) concentration in the frontal cortex, striatum and hippocampus; as well as the plasma CORT levels and behavioral alterations in rats submitted to early protein malnutrition and environmental stimulation, following exposure to the elevated plus-maze test.

Methods

Animals

Male Wistar (*Rattus norvegicus*) rats from the animal colony of the Ribeirão Preto Campus of the University of São Paulo were used. Each litter was culled to 6 male and 2 female pups on the day of birth. The dams and the pups were housed in transparent plastic cages (40 x 30 x 20 cm) and assigned randomly to a 6% or a 16% protein *ad libitum* diet. The diets were offered during lactation to both mother and nestlings, and post-lactation phases until day 35 of age. During lactation, the whole litters were weighed on days 0, 7, 14 and 21 of life, while in the post-natal period the animals were individually weighed on days 21, 28 and 35.

The diets were prepared according to the nutrient proportions recommended by the AIN (American Institute of Nutrition) and AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) as described by Reeves, Nielsen and Fahey (1993) and Rocinholi et al. (1997). Briefly, the protein-deficient diet contained approximately 8% casein (6% protein), 5% salt mixture, 1% vitamin mixture, 8% corn oil, 0.2% choline, and 77.8% corn starch (w/w). The regular protein diet contained approximately 20% casein (16% protein), 60.8% corn starch and the same percentage of the other constituents as the protein-deficient diet. The two diets were supplemented with L-methionine (2.0 g/kg protein) since casein is deficient in this amino acid.

The animals were divided into litters according to three variables. The first variable was the diet condition, with well-nourished (W) animals receiving a 16% and malnourished (M) animals receiving a 6% protein diet. The second variable was the stimulation condition, with

animals submitted (S^+) or not (S^-) to environmental stimulation. The third variable was the test condition, with animals being submitted (T^+) or not (T^-) to the EPM. This experimental design produced the following 8 groups of conditions WS^-T^-, WS^-T^+, WS^+T^-, WS^+T^+, MS^-T^-, MS^-T^+, MS^+T^- and MS^+T^+.

After weaning, the male animals were placed in individual cages of polypropylene measuring 30 x 19 x 13 cm, according to the distribution of the above groups (n = 12 per group). During all this period the groups submitted to stimulation received environmental stimulation, which consisted of holding the nestling with one hand and sliding the thumb of the other hand on the back of the animal in the cephalo-caudal direction for three minutes, followed by sonorous stimulation with sounds of 3KHz and 70 dB for 3 minutes at regular intervals of 24 seconds. On the 36th day of life the tested groups were submitted to the EPM and, after 30 min, removed from the home cage and decapitated. All groups were decapitated in the morning between 08:00 a.m and 10:00 am, observing the nadir period of the HPA axis (Guillemin, Dear, & Liebelt, 1959).

After decapitation the animals had their blood collected for CORT analysis, and the frontal cortex, striatum and hippocampus were quickly dissected. The samples, after fresh weighing, were frozen to -70 ^{0}C, a procedure that permits a storage of the material for at least six months (Halline, Dudeja, & Brasitus, 1989).

The animals were maintained on a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 am) with room temperature kept at 23-25 ^{o}C, and with free access to water and food throughout the experiment. The experiments were performed in compliance with the recommendations of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (SBNeC), which are based on the US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Behavioral Analysis

The behavioral analysis was conducted in the EPM apparatus. The EPM was made of wood and consisted of two open arms (50 x 10 cm) opposite to each other, crossed by two enclosed arms (50 x 10 x 40 cm), with an open roof (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). The maze was elevated 50 cm from the ground. Fluorescent ceiling light (40 W) provided the only illumination in the experimental room. All the tests occurred in the morning between 08:00 and 10:00 am. The animals were individually placed in the center of the maze, facing an enclosed arm, and allowed to explore for 5 minutes. The experimental sessions were recorded by a video-camera mounted vertically above the EPM and afterwards analyzed using the software X-Plo-Rat 2005 version 1.1.0, developed in the Laboratory of Exploratory Behavior of the Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto (USP), available at http://scotty.ffclrp.usp.br. The following behaviors were analyzed: 1) percentage of open arm entries (an arm entry defined as the rat having all four paws into an arm), 2) time spent in the open arms, 3) closed-arm entries, 4) rearing (rising on the hind paws), 7) head-dipping (scanning over the sides of the maze toward the floor), 8) stretch-attend posture (forward elongation of head and shoulders followed by retraction to the original position). The behavioral categories stretch-attend posture and head-dips have been previously described as risk-assessment behaviors (Moreira et al., 1997).

Biochemical Analysis

Polyamines

After homogenizing and deproteinizing, each sample was filtered and analyzed with HPLC, using ion-pair reversed phase chromatography with o-ftaldialdehyde post-column derivatization, as described previously (Löser, Wunderlich, & Fölsch, 1988), and modified for a final dilution of 1/10. The results were described in nanomoles per gram of tissue. The normalization to milligrams of protein for each sample was accomplished and supplied similar results.

Corticosterone analysis

Plasma CORT levels were obtained through a specific radio-imunoassay method, after ethanol extraction, as previously described (Elias, Antunes-Rodrigues, Elias, & Moreira, 1997; Elias, Elias, Castro, Antunes-Rodrigues, & Moreira, 2004). The anti-corticosterone antibody was kindly supplied by Dr. José Gilberto Vieira (Federal University of São Paulo, Brazil) and the 1,2,6,7 3H corticosterone was bought from GE Healthcare Life Sciences (USES). The assay sensibility and the intra and inter-assay coefficient variations were 0.4 µg/dL, 5.1% and 8.4%, respectively.

Table 1. Mean weight ± SEM of nestlings at 0.21 and 35 days of life

groups	days	mean ± SEM
	0	8.87 ± 0.40
WS^-	21	56.53 ± 1.89
	35	141.8 ± 4.81
	0	8.79 ± 0.87
MS^-	21	21.97 ± 0.57
	35	27.41 ± 1.02
	0	8.58 ± 0.67
WS^+	21	49.35 ± 1.98
	35	127.9 ± 5.40
	0	7.95 ± 0.40
MS^+	21	21.05 ± 0.73
	35	27.75 ± 1.14

Table 2. Plasma CORT concentration (µg/dL) in the experimental groups (n = 96)

CORT (mean ± SEM)			
groups	µg/dL	groups	µg/dL
WS^-T^-	0.78 ± 0.08	MS^-T^-	8.51 ± 1.43
WS^-T^+	4.33 ± 0.46	MS^-T^+	14.55 ± 1.08
WS^+T^-	4.15 ± 0.79	MS^+T^-	9.24 ± 1.54
WS^+T^+	5.81 ± 0.83	MS^+T^+	8.29 ± 1.76

Protein analysis

The Coomassie blue method with the Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD Protein Assay) and bovine albumin (Pierce Protein assay reagents) was used (Bradford, 1976) for tissue and plasma protein dosage.

Statistical analysis

Statistical analysis, using the Statistica® software, was conducted applying a 3-factor analysis of variance (ANOVA), with diet, stimulation and test conditions as main factors. When appropriate, *post hoc* comparisons were made using the Newman-Keuls test. The level of significance was set at 0.05.

Results

Body weight

The weights of the animals during lactation and post-lactation are presented in Table 1. The ANOVA did not show differences in birth weight [$F(1,13) = 0.31$; $p > 0.05$] of animals designed to different diet conditions. However, at the end of the lactation period (21 days of age) there was a significant effect of diet [$F(1,100) = 466.36$; $p < 0.001$], with lower weight in malnourished animals when compared with well-nourished ones. In addition, there was a significant effect of stimulation [$F(1,100) = 7.75$; $p < 0.01$], with higher weight in the stimulated animals as compared with non-stimulated ones. Finally, there was a significant diet by stimulation interaction [$F(1,100) = 4.61$; $p < 0.05$]. At 35 days of age there was a significant effect of diet [$F(1,100) = 820.42$; $p < 0.001$], with lower weight in malnourished as compared with well-nourished animals. However,

Table 3. Plasma protein concentration (g/dL) in the experimental groups (n = 96)

Plasma protein (mean ± SEM)			
Groups*	g/dL	groups	g/dL
WS^-T^-	6.99 ± 0.19**	MS^-T^-	4.44 ± 0.22$^{\#}$
WS^-T^+	5.71 ± 0.26	MS^-T^+	4.37 ± 0.30
WS^+T^-	6.41 ± 0.10	MS^+T^-	5.11 ± 0.24
WS^+T^+	6.34 ± 0.21	MS^+T^+	4.37 ± 0.29

* $p < .05$ compared to malnourished groups; ** $p < .05$ compared to WS^-T^+; and $^{\#}$ $p < .05$ compared to MS^+T^-.

Table 4. Tissue protein concentration in mg/g of tissue (mean ± SEM) in the frontal cortex (FC), striatum (ST) and hippocampus (HC) of the experimental groups (n = 96)

groups (FC)	protein (mg/g)	
A x B	A	B
WS-T- x WS-T+	236.4 ± 50.23 *	124.1 ± 20.71
WS+T- x WS+T+	208.5 ± 32.80	254.7 ± 32.54
MS-T- x MS-T+	220.6 ± 29.24 *	159.2 ± 13.46
MS+T- x MS+T+	193.8 ± 18.18	171.1 ± 9.54

ANOVA + Newman-Keuls post hoc: stimulation vs. test [$F(1.83) = 5.61$; $p < .05$]: NET < ET ($p < .05$), NET < NENT ($p < .05$).

groups (ST)	protein (mg/g)	
A x B	A	B
WS-T- x WS-T+	230.2 ± 61.93 *	119,6 ± 16.25
WS+T- x WS+T+	264.9 ± 52.19	242.7 ± 27.42
MS-T- x MS-T+	218.5 ± 39.75 *	144.7 ± 22.16
MS+T- x MS+T+	155.3 ± 16.58	136.4 ± 28.54

ANOVA + Newman-Keuls post hoc: test [$F(1.68) = 4.06$; $p < .05$]; diet vs. stimulation [$F(1.68) = 4.19$; $p < .05$]: WS+ > MS+ ($p < .05$).

groups (HC)	protein (mg/g)	
A x B	A	B
WS-T- x WS-T+	233.8 ± 46.42 *	85.19 ± 12.1
WS+T- x WS+T+	236.7 ± 35.56	267.9 ± 40.4
MS-T- x MS-T+	296.1 ± 47.16 *	144.4 ± 12.26
MS+T- x MS+T+	192.9 ± 11.11	175.9 ± 21.29

ANOVA + Newman-Keuls post hoc: diet vs. stimulation [$F(1, 85) = 7.33$; $p < .01$]: WS- < WS+ ($p < .05$); stimulation vs. test [$F(1.85) = 10.96$; $p < .001$]: S-T- > S-T+ ($p < .001$), S+T+ > S-T+ ($p < .01$).

there were no significant effects of stimulation or diet by stimulation interaction.

Corticosterone and plasma protein analysis

The results of the statistical analysis on plasma CORT are presented in Table 2.

There was a significant effect of diet [$F(1,88) = 57.89$; $p < .001$] with malnourished presenting higher values of CORT as compared with well-nourished animals. There was also a significant effect of testing [$F(1,88) = 9.70$; $p < .05$] with tested animals presenting higher levels of CORT when compared with non-tested animals. No effects of stimulation were observed.

A significant diet by stimulation interaction was found [$F(1,88) = 9.49$, $p < .01$]. Post-hoc analysis with the Newman-Keuls test showed that environmental stimulation significantly increased CORT in well-nourished animals ($p < .05$) while significantly decreasing it in malnourished ones ($p < .01$). There was also a significant stimulation by test interaction [$F(1,88) = 7.25$; $p < 01$] with Newman-Keuls post-hoc analysis showing a significant increase in CORT levels as the result of testing in non-stimulated animals ($p < .05$), whereas testing did not alter the levels of CORT in stimulated animals.

The results of the statistical analysis on total plasma protein are presented in Table 3.

The total plasma protein analysis showed a significant effect of diet [$F(1,95) = 117,76$, $p < .001$] with well-nourished presenting higher values as compared with malnourished animals. There was also a significant effect of testing [$F(1,95) = 10.72$; $p < .001$] with tested animals presenting lower levels of plasma protein as compared with non-tested ones. Finally, there was also a significant diet by stimulation by test interaction [$F(1,95) = 8,10$; $p < .05$]. Post-hoc analysis showed that EPM testing decreased plasma protein levels in well-nourished non-stimulated animals ($p < .05$) but did not affect it in stimulated well-nourished ones.

Tissue protein analysis

The results of tissue protein determination in the frontal cortex, striatum, and hippocampus are presented in Table 4.

Table 5. Polyamines putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) concentration (mean ± SEM) in nanomoles per tissue weight (gram) in the frontal cortex, striatum and hippocampus of well-nourished animals. Putrescine was not detected (n.d.) in frontal cortex and striatum. * = $p < .05$

Frontal Cortex	WS-T-	WS-T+	WS+T-	WS+T+
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	280.3 ± 26.56 *	201.4 ± 22.9	296.9 ± 24.21	308.7 ± 35.16
SPM	343.8 ± 39.44 *	159.4 ± 27.12	284.8 ± 29.84	319.3 ± 38.94
SPD+SPM	624.1 ± 61.41 *	353.2 ± 47.17	581.7 ± 43.52	628.1 ± 73.87
SPD/SPM	0.878 ± 0.08	1.35 ± 0.19 *	1.18 ± 0.14	0.98 ± 0.02
Striatum	**WS-T-**	**WS-T+**	**WS+T-**	**WS+T+**
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	389.3 ± 46.1	385.8 ± 29.97	431.7 ± 23.59	460.4 ± 43.49
SPM	260 ± 29.7	271.9 ± 48.75	297.8 ± 22.22	362.8 ± 36.96
SPD+SPM	649.3 ± 66.71	657.8 ± 73.92	729.5 ± 34.6	823.2 ± 72.33
SPD/SPM	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.5	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Hippocampus	**WS-T-**	**WS-T+**	**WS+T-**	**WS+T+**
PUT	0.82 ± 0.17	0.63 ± 0.004	1.23 ± 0.24	1.23 ± 0.17
SPD	410 ± 48.42	401.1±41.26	489.7 ± 40.67	452 ± 59.94
SPM	319.8 ± 41.54	255.1 ± 49.11	360.4 ± 29.89	339.5 ± 35.93
SPD+SPM	729.8 ± 87.68	656.2 ± 85.17	850 ± 62.84	815.4 ± 93.95
SPD/SPM	1.35 ± 0.1	2.5 ± 0.5 *	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1

Table 6. Polyamines putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) concentration (mean ± S.E.M) in nanomoles per tissue weight (gram) in the frontal cortex, striatum and hippocampus of malnourished animals. Putrescine was not detected (n.d.) in frontal cortex and striatum. * = p < .05

Frontal Cortex	MS-T-	MS-T+	MS+T-	MS+T+
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	312.4 ± 8.29 *	206.9 ± 35.57	264.4 ± 18.4	327.8 ± 18.65
SPM	368.9 ± 14.84 *	218.7 ± 31.3	267.8 ± 26.69 *	153.2 ± 16.92
SPD+SPM	681.3 ± 19.91 *	407.3 ± 64.11	532.2 ± 41.42	481 ± 28.4
SPD/SPM	0.85 ± 0.03	0.84 ± 0.06	0.98 ± 0.07	2.34 ± 0.19 *
Striatum	**MS-T-**	**MS-T+**	**MS+T-**	**MS+T+**
PUT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SPD	474.3 ± 32.72 *	316.9 ± 47.17	414.4 ± 30.4	442.4 ± 49.1
SPM	332.8 ± 20.33 *	255 ± 44.18	233.1 ± 27.74 *	129.8 ± 10.13
SPD+SPM	807.1 ± 48.36 *	571.8 ± 87.86	629.5 ± 43.17	587.8 ± 65.45
SPD/SPM	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	3.3 ± 0.4 *
Hippocampus	**MS-T-**	**MS-T+**	**MS+T-**	**MS+T+**
PUT	1.40 ± 0.12	2.26 ± 0.38 *	1.36 ± 0.15	2.05 ± 0.56
SPD	522 ± 20.51 *	348.6 ± 39.07	398.7 ± 38.27	409.4 ± 40.5
SPM	406.6 ± 25.07 *	281.5 ± 37.62	234 ± 32.94 *	164.2 ± 17.06
SPD+SPM	928.6 ± 35.44 *	630 ± 74.95	632.8 ± 57.38	573.5 ± 44.92
SPD/SPM	1.3 ± 0.08	1.3 ± 0.07	1.9 ± 0.3	2.7 ± 0.3

In the frontal cortex there were no significant differences due to diet, stimulation and testing factors, but a significant effect of the stimulation by testing interaction was demonstrated [$F(1,83) = 5.61$; $p < .05$]. Post-hoc analysis showed that EPM testing significantly decreased protein levels in non-stimulated animals ($p < .05$) with no effects on stimulated ones.

In the striatum there were no significant differences due to diet and stimulation factors, but there was a significant effect of testing [$F(1,68) = 4.06$; $p < .05$] with EPM tested animals presenting lower protein levels as compared with non-tested animals. There was also a significant diet by stimulation interaction [$F(1,68) = 4.19$; $p<0.05$] with the post-hoc analysis showing that stimulation significantly increased protein levels in well-nourished ($p < .05$) while significantly decreasing these levels in malnourished ones ($p < .05$).

In the hippocampus there were no significant differences due to diet and stimulation factors, but there was a significant effect of testing [$F(1,85) = 9.07$; $p < .01$] with EPM tested animals presenting lower protein levels as compared with non-tested animals. There was also a significant effect of the diet by stimulation interaction [$F(1,85) = 7.33$, $p < 01$] with post-hoc analysis showing that stimulation significantly increased protein levels in well-nourished animals ($p < .05$) and decreased the same levels in malnourished ones ($p < .05$). Finally, there was a significant stimulation by testing interaction [$F(1,85) = 10.96$; $p < .001$] with the post-hoc analysis showing that EPM testing significantly decreased protein levels in non-stimulated animals ($p < .05$) while increasing them in stimulated ones ($p < .05$).

Polyamine analysis

The measures of tissue concentration of putrescine, spermidine, and spermine are presented in Tables 5 and 6.

Putrescine was not detected in the frontal cortex and striatum. In the hippocampus, there was only a significant effect of diet [$F(1,32) = 17.67$; $p < .01$], with malnourished animals presenting higher concentrations

as compared with well-nourished ones.

In relation to spermidine in the frontal cortex, there was a significant effect of stimulation [F(1, 91) = 7.28; p < .01] and a significant interaction between stimulation and testing [F(1, 91) = 12.67; p < .001]. *Post-hoc* analysis showed that while EPM testing decreased spermidine values in non-stimulated animals, they were increased in stimulated ones (p < .05). In the striatum there was only a stimulation by testing effect [F(1,94) = 4.06; p < .05], with *post-hoc* analysis showing that while EPM testing increased spermidine values in non-stimulated animals, it decreased those values in stimulated ones (p < .05). No effects were observed in the hippocampus.

Regarding spermine in the frontal cortex, there was a significant effect of stimulation [F (1,89) = 23.34; p < .001), with stimulated animals presenting lower values as compared with non-stimulated animals (p < .05). There was also a significant diet by stimulation by testing interaction [(F(1,89) = p < .05]. In the striatum there was a significant effect of diet [F(1,91) = 6.77; p < .05]. There were also significant interactions between diet and stimulation factors [F(1,91) = 14.46; p < .001] and between diet and testing factors [F(1,91) = 7.71; p < .05]. *Post-hoc* analysis showed that while both environmental stimulation and EPM testing increased spermine values in well-nourished animals, they produced a decrease in malnourished ones (p < .05). In the hippocampus there was a significant effect of EPM testing [F(1,93) = 7.92; p < .01], with tested animals presenting lower spermine values as compared with non-tested ones (p < .05). There was also a significant diet by stimulation interaction [F(1,93) = 17.33; p < .001], with environmental stimulation increasing spermine values in well-nourished animals, while decreasing them in malnourished ones (p < .05).

The data of spermidine + spermine in the frontal cortex showed that there was a significant effect of stimulation [F(1,90) = 14.28; p < .001], with stimulated animals presenting higher values as compared with non-stimulated ones (p < .05). There were also significant interactions between diet and stimulation factors [F(1,90) = 4.48; p < .05] and between stimulation and testing factors [F(1,90) = 13.78; p < .001]. *Post-hoc* analysis showed that while environmental stimulation increased spermidine + spermine values in well-nourished animals, it produced a decrease in malnourished ones (p < .05). *Post-hoc* analysis also showed that while EPM testing decreased spermidine + spermine values in non-stimulated animals, it did not alter the values in stimulated ones (p < .05).

Regarding the spermidine + spermine values in the striatum, there were only significant interactions between diet and stimulation [F(1,92) = 5.25; p < .05] and between diet and testing [F(1,92) = 4.55; p < .05]. *Post-hoc* analysis showed that while both environmental stimulation and EPM testing increased values in well-nourished animals, these values were decreased in malnourished ones (p < .05).

The data concerning spermidine + spermine in the hippocampus showed a significant effect of stimulation [F(1,93) = 5.39; p < .05] with stimulated animals presenting lower values as compared with non-stimulated ones. There was also a significant effect of the diet by stimulation interaction [F(1,93) = 9.90; p < .05], with *post-hoc* analysis showing that, while stimulation increased the spermidine + spermine values in well-nourished animals, these values were decreased in malnourished ones (p < .05).

The data related to the spermidine/spermine ratio in the frontal cortex showed significant effects of stimulation [F(1,91) = 20.70; p < .001], with stimulated animals presenting higher values as compared with non-stimulated ones, and significant effects of testing [F(1,91) = 22.19; p < .001], with EPM tested animals presenting higher values as compared with non-tested ones. There were also significant interactions between diet and stimulation [F(1,91) = 24.11; p < .001], diet and testing [F(1,91) = 9.57; p < .01], and stimulation and testing [F(1,91) = 4.29; p < .05]. Finally, there was a diet by stimulation by testing interaction [F(1,91) = 35.41; p < .001].

In the striatum, the spermidine/spermine ratio showed a significant effect of diet [F(1,92) = 4.11; p < .05], with well-nourished animals presenting higher values as compared with malnourished ones. There were also significant effects of stimulation [F(1,92) = 4.54; p < .05], with stimulated animals presenting higher values as compared with non-stimulated ones; and significant effects of testing [F(1,92) = 4.98; p < .05], with EPM tested animals presenting higher values as compared with non-tested ones. The diet by stimulation factor [F(1,92) = 26.77; p < .001] and diet by stimulation by testing factors [F(1,92) = 12.52; p < .001] were also significant.

Finally, in the hippocampus the spermidine/spermine ratio showed a significant effect of testing [F(1,93) = 6.17; p < .05], with EPM tested animals presenting higher values as compared with non-tested ones. There were also significant effects of diet by stimulation [F(1,93) = 21.34; p < .001] and diet by stimulation by testing [F(1,93) = 5.56; p < .05] interactions.

Behavior in the Elevated Plus-Maze

The behavioral data in the EPM are presented in Table 7.

The percentage of open arm entries showed a significant effect of diet [F(1,46) = 38.70; p < .001], with malnourished animals presenting a higher number of entries as compared with well-nourished ones. No effects of stimulation or diet by stimulation interactions were observed. This result was the same for the percentage of time spent in the open arms with a significant effect of diet only [F(1,46) = 18.66; p < .001].

The number of closed arm entries showed a

Table 7. Mean ± S.E.M. values for behavioral categories recorded in the EPM test. * = diet effect and † = stimulation at $p < .05$

CATEGORIES / GROUP	WS^-	MS^-	WS^+	MS^+
Open arms entrance (%)	20.32 ± 4.96	46.3 ± 1.76 *	28 ± 1.75	42.3 ± 3.67 *
Time in open arms (%)	10.46 ± 3.61	28.07 ± 3.34 *	12.99 ± 1.86	24.17 ± 4.0 *
Closed arms entries	9.25 ± 1.16	8.43 ± 0.68	12.92 ± 0.74 *†	8.92 ± 0.48
Head-dips	9.5 ± 2.1	15.36 ± 2.04 *	8.75 ± 0.98	12.25 ± 2.11 *
Rearing	9.83 ± 0.65 *	4.21 ± 0.55	15.75 ± 0.89 *†	9 ± 1.0 †††
Grooming	2.92 ± 0.68	4.86 ± 1.29	2.5 ± 0.48	2.83 ± 0.6
Stretch-attend posture	10.58 ± 1.46 *	5.36 ± 1.21	18.92 ± 1.38 *†	12.5 ± 2.11 †
Time spent in stretch-attend	38.61 ± 6.0 *	7.51 ± 1.95	35.79 ± 4.2	26.24 ± 6.10 †

significant effect of diet [$F(1,46) = 9.16$; $p < .01$], with well-nourished animals presenting a higher number of entries as compared with malnourished animals. There was also a significant effect of stimulation [$F(1,46) = 6.80$; $p < .05$], with stimulated animals entering more the closed arms as compared with non-stimulated animals.

The data on rearing behavior indicated a significant effect of diet [$F(1,46) = 61.11$; $p < .001$], with well-nourished animals showing higher values as compared with malnourished ones. There was also a significant effect of stimulation [$F(1,46) = 45.75$; $p < .001$], with stimulated animals presenting higher values as compared with non- stimulated ones.

Regarding the head-dipping behavior, significant effects of diet [$F(1,46) = 6.11$; $p < .05$] were found, with malnourished animals presenting higher values as compared with well-nourished ones.

In the stretch-attend behavior, a significant effect of diet was found [$F(1,46) = 13.95$; $p < .01$], with well-nourished animals presenting higher values as compared with malnourished ones. There was also a significant effect of stimulation [$F(1,46) = 24.66$; $p < .001$], with stimulated animals presenting higher values as compared with non-stimulated ones.

No differences in the grooming behavior were found.

Discussion

The data reported here describe the effects of protein malnutrition and environmental stimulation on the anxiety behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity after exposing the rat to the EPM.

The malnourished animals showed elevated basal plasma CORT as compared with well-nourished ones and responded with increasing levels of glucocorticoid after EPM exposure, as previously described (File, Zangrossi, Sanders, & Mabbutt, 1994; Jacobson et al., 1997; Rodgers et al., 1999; Sobotka, Cook, & Brodie, 1974). This result confirms that protein malnutrition is a chronic stimulus upon the activity of the HPA axis which preserves the responsivity to other stressors at the same time that it elevates the basal levels of glucocorticoids. The repetitive environmental stimulation, acting as a mild chronic stressor, may be contributing to the basal CORT elevation in well-nourished animals. According to Dallman et al. (1987), basal plasma CORT concentration is less than 1 µg/dL in undisturbed rats with free access to food and water. Food and water deprivation for 12 or more hours can raise plasma CORT concentration to values between 5 and 9 µg/dL (Dallman et al., 1987). This elevation can be the result of increased central drive, resulting in elevated secretion of CRF and ACTH during the normal trough on adrenocortical system function.

Interestingly, the fact that animals submitted to the environmental stimulation did not increase plasma CORT levels after EPM exposure as compared with non-stimulated animals may suggest that chronic environmental stimulation beginning at birth (Fenoglio, Brunson, Avishai-Eliner, Chen, & Baram, 2004) leads to adaptations in the HPA axis, which include the fastest response or less prolonged secretion of CORT (Hess, Denenberg, Zarrow, & Pfeifer, 1969; Jutapakdeegul et al., 2003; Plotsky & Meaney, 1993) and catecholamines (Meerlo, Horvath, Nagy, Bohus, & Koolhass, 1999) after acute stressor exposure. This fact can be due to a higher sensitivity of the HPA axis to the negative feedback, related to the increased glucocorticoid receptor expression in the rat hippocampus and frontal cortex (Jutapakdeegul et al., 2003). Thus, the raise in CORT plasma levels, as a result of EPM exposure, is of a smaller magnitude or peaked earlier in animals in both diet conditions submitted to the environmental stimulation.

The lower values of total plasma protein in the malnourished rats as compared with well-nourished animals may suggest a large free CORT circulating fraction. Gelfand, Mathews, Bier and Sherwin (1984) reported that prolonged glucocorticoid, epinephrine, and nor-epinephrine elevation in situations of severe stress

contributes to the massive loss of nitrogen, muscular proteolysis, and hyper-metabolism. Wronska, Niezgoda, Sechman and Bobek (1990) described that the suppression of catabolic hormones elevation induced by stress, in food deprived animals, contributes for the decrease of the metabolic rate and preservation of corporal protein.

The present study described the decrease of tissue protein levels in the frontal cortex, striatum, and hippocampus thirty minutes after EPM testing in non-stimulated animals in both diet conditions, an effect not observed in animals previously submitted to environmental stimulation. Better stress coping conditions in the stimulated animals, which may be reflected by a shorter, less prolonged, elevation of plasma CORT levels after the EPM test, may be contributing to the absence of proteolysis in the same magnitude as that observed in non-stimulated animals. It is also possible that, after the exposure of stimulated animals to the EPM, the reactive catecholamines secretion is being less intense or shorter (Lucion, Pereira, Winkelman, & Sanvitto, 2003), as also described by Konarska, Stewart and McCarty (1989) after exposure to chronic intermittent stress. In the present study, the concentration of total plasma protein was also smaller after EPM testing in well-nourished non-stimulated animals.

To the transitory activation of the cerebral polyamine metabolism under glucocorticoid influence, Gilad, Rabey, Kimiagar and Gilad (2001) referred to the polyamine stress response (PSR). PSR can be considered as a cellular specific biochemical mechanism, demonstrating the capacity of the brain to control the cellular polyamines homeostasis under stressful conditions uniquely or repeatedly presented. In this work, the reaction of polyamine metabolism to the EPM exposure was observed, characterizing itself by the decrease of spermidine and spermine concentrations, and of the spermidine + spermine [SPD+SPM] pool in the frontal cortex in well-nourished non-stimulated animals, and in the frontal cortex, striatum, and hippocampus in malnourished non-stimulated animals. No differences were observed in basal spermidine and spermine levels in the three structures in animals in both diet conditions (no stimulation and no EPM testing), suggesting the plasticity of malnourished organisms in the polyamine homeostasis maintenance. The plasma CORT elevation, fall of tissue protein concentration, and activation of polyamines catabolism in groups under similar experimental conditions, mostly in the frontal cortex and hippocampus, suggest the interaction of these factors in the PSR observed. Thus, at the cellular level, CORT elevation induces catabolism of polyamines, after SSAT activation, with a decrease of tissue protein by oxidative stress, and a possibly larger quantity of free polyamines in the cytoplasm, with N^1-acetylspermidine and N^1-acetylspermine efflux to the extracellular space and the consequent decrease of the spermidine and spermine pool and, mostly, spermine with occurrence or not of variations on the SPD/SPM ratio. The altered PSR in animals previously submitted to the environmental stimulation would be explained by the different coping of the HPA axis under the stress condition, as described above, with the PSR reflecting the changes in plasma CORT concentration in these groups.

The spermidine/spermine ratio (SPD/SPM) has been used as a more reliable measure of spermidine formation from spermine during the polyamine inter-conversion cycle (Seiler & Bolkenius, 1985). Hixson, Emerson, Shassetz and Gerner (1994) reported that the SPD/SPM ratio is the less susceptible indicator to measure mistakes because it does not depend on a second measure for normalization, like the weight or protein content of the samples. It is interesting that malnourished stimulated animals, even without significant alterations of CORT levels and tissue protein concentration after EPM exposure, showed activation of the polyamine metabolism, with elevation of the SPD/SPM ratio in the frontal cortex and striatum, but not in the hippocampus, a more plastic structure due to spermine concentration fall and preservation of spermidine content.

Regarding the behavioral analysis in the EPM, as reported elsewhere (Moreira et al., 1997) protein malnutrition resulted in greater exploration of the open arms, indicating lower anxiety and/or greater impulsiveness. In addition, a higher frequency of head-dipping and a lower rate of stretch-attend behaviors were observed, indicating impairments of risk-assessment behaviors in malnourished animals. The decrease in rearing behavior, as the result of early malnutrition, may suggest impaired exploratory behavior.

Acknowledgements

The authors express gratefulness to Gilberto João Padovan, chemist of the Mass Spectrometry Laboratory at the Nutrition Division of the Medical Clinical Department of the Medicine Faculty at Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP-Brazil), by the assistance in the chromatography analysis; Maria Valci Aparecida dos Santos, technician at the Neuroendocrinology Laboratory of the Medicine Physiology Department of the Medicine Faculty at Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP-Brazil), by the assistance in the analysis of corticosterone and protein levels; Dalmo Presta Nicola, technician at the Nutrition, Development and Behavior Laboratory of the Philosophy, Sciences and Letters Faculty of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP-Brazil), by the assistance in the animal care and behavioral tests.

References

Almeida, S.S., Garcia R.A., Cibien, M.M.R., de Araújo, M., Moreira, G.M.S., & de Oliveira, L.M. (1994). The ontogeny of exploratory behaviors in early-protein-malnourished rats exposed to the elevated plus-maze test. *Psychobiology, 22*, 283-288.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248-254.

Dallman, M.F., Akana, S.F., Cascio, C.S., Darlington, D.N., Jacobson, L., & Levin, N. (1987). Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Progress in Hormone Research, 43*, 113-173.

de Kloet, E.R., Oitlz, M.S., & Joëls, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neuroscience, 22*, 422-426.

Dudkowska, M., Lai, J., Gardini, G., Stachurska, A., Grzelakowska-Sztabert, B., Colombatto, S., & Manteuffel-Cymborowska, M. (2003). Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of polyamines and cell proliferation. *Biochimica et Bophysica Ata, 1619*, 159-166.

Elias, L.L., Antunes-Rodrigues, J., Elias, P.C., & Moreira, A.C. (1997). Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. *Journal of Endocrinology Metabolism, 82*, 1243-1247.

Elias, P.C., Elias, L.L., Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., & Moreira, A.C., (2004). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. *Journal of Endocrinology, 180*, 297-302.

Fenoglio K.A., Brunson, K.L., Avishai-Eliner, S., Chen, Y., & Baram, T.Z. (2004). Region-specific onset of handling-induced changes in corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor expression. *Endocrinology, 145*, 2702-2706.

File, S.E., Zangrossi Jr., H., Sanders, F.L., & Mabbutt, P.S. (1994). Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology, 113*, 543-546.

Fogel-Petrovic, M., Vujcic, S., Miller, J., & Porter, C.W. (1996). Differential post-transcriptional control of ornithine decarboxylase and spermidine-spermine N1-acetyltransferase by polyamines. *FEBS Letters, 391*, 89-94.

Gelfand, R.A., Matthews, D.E., Bier, D.M., & Sherwin, R.S. (1984). Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress. *Journal of Clinical Investigation, 74,* 2238-2248.

Gilad, V.H., Rabey, J.M., Kimiagar, Y., & Gilad, G.M. (2001). The polyamine stress response: tissue-, endocrine-, and developmental-dependent regulation. *Biochemical Pharmacology, 61*, 207-213.

Guillemin, R., Dear, W.E., & Liebelt, R.A. (1959). Nychthemeral variations in plasma free corticosteroid levels of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 101*, 394-395.

Halline, A.G., Dudeja, P.K., & Brasitus, T.A. (1989). 1, 2-Dimethylhydrazine-induced alterations in N1-acetylspermidine levels and spermidine N1-acetyltransferase activity in rat colonic mucosa. *Cancer Research, 49*, 633-638.

Hayashi, S., & Murakami, E. (1995). Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochemistry Journal, 306*, 1-10.

Hess, J.L., Denenberg, V.H., Zarrow, M.X., & Pfeifer, W.D. (1969). Modification of the corticosterone response curve as a function of handling in infancy. *Physiology and Behavior, 4*, 109-111.

Hixson, L.J., Emerson, S.S., Shassetz, R., & Gerner, E.W. (1994). Sources of variability in estimating ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in human colorectal mucosa. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 3*, 317-323.

Hyvönen, T. (1989). Excretion of acetylated and free polyamines by polyamine depleted Chinese hamster ovary cells. *International Journal of Biochemistry, 21*, 313-316.

Ientile, R., De Luca, G., Di Giorgio, R.M., & Macaione, S. (1988). Glucocorticoid Regulation of Spermidine acetylation in the rat brain. *Journal of Neurochemistry, 51*, 677-682.

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 271*, 559-564.

Jacobson, L., Zurakowski, D., & Majzoub, J.A. (1997). Protein malnutrition increases plasma adrenocorticotropin and anterior pituitary proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology, 138*, 1048-1057.

Jutapakdeegul, N., Casalotti, S.O., Govitrapong, P., & Kotchabhakdi, N. (2003). Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels and glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. *Developmental Neuroscience, 25*, 26-33.

Konarska, M., Stewart, R.E., & McCarty, R. (1989). Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiology and Behavior, 45*, 255-261.

Ladd, C.O., Owens, M.J., & Nemeroff, C.B. (1996). Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. *Endocrinology, 137*, 1212-1218.

Levitsky, D.A., & Strupp, B.J.E. (1995). Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *Journal of Nutrition, 125*, 2221S-2232S.

Lister, J.P., Blatt, G.J., DeBassio, W.A., Kemper, T.L., Tonkiss, J., Galler, J.R., & Rosene, D.L. (2005). Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus, 15*, 393-403.

Löser, C., Wunderlich, U., & Fölsch, U.R. (1988). Reversed-phase liquid chromatographic separation and simultaneous fluorimetric detection of polyamines and theirs monoacetyl derivatives in human and animal urine, serum and tissue samples: an improved, rapid and sensitive method for routine application. *Journal of Chromatography, 430*, 249-262.

Lucion, A.B., Pereira, F.M., Winkelman, E.C., & Sanvitto, G.L. (2003). Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience, 117*, 894-903.

Meerlo, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohus, B., & Koolhass, J.M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology, 11*, 925-933.

Mesquita, R.M., Pereira, P.A., & Andrade, J.P. (2002). Low levels of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B are related to loss of dentate granule cells after prolonged low-protein feeding in the rat. *Neuroscience Letters, 330*, 155-158.

Mirescu, C., Peters, J.D., & Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience, 7*, 841-846.

Moreira, G.M.S., de Araujo, M., de Oliveira, L.M., & Almeida, S.S. (1997). The behavior of protein-calorie-malnourished rats on the elevated plus-maze test: an ethopharmacological analysis. *Psychobiology, 25*, 180-185.

Morgane, P.J., Mokler, D.J., & Galler, J.R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 26*, 471-483.

Pegg, A.E. (1988). Polyamine Metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Research, 48*, 759-774.

Pegg, A.E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry, 281*, 14529-14532.

Pellow, S., Chopin, P., File, S., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods, 14*, 149-167.

Plotsky, P.M., & Meaney, M.J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research, 18*, 195-200.

Ramos, C.F., Lima, A.P.S., Teixeira, C.V., Brito, P.D., & Moura, E.G. (1997). Thyroid function in post-weaning rats whose dams were fed a low-protein diet during suckling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30*, 133-137.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey Jr., G.C. (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *Journal of Nutrition, 123*, 1939-1951.

Rocinholi, L.F., Almeida, S.S., & de Oliveira, L.M. (1997). Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30*, 407-413.

Rodgers, R.J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T.J., & Brain, P.F. (1999). Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology &*

Behavior, 68, 47-53.

Rosenzweig, M.R., Bennet, E.L., & Diamond, M.C. (1972). Brain changes in response to experience. *Scientific American, 226*, 22-29.

Satriano, J., Ishizuka, S., Archer, D.C., Blantz, R.C., & Kelly, A.C.J. (1999). Regulation of intracellular polyamine biosynthesis and transport by NO and cytokines TNF-alpha and IFN-gamma. *American Journal of Physiology, 276*, C892-C899.

Schanberg, S.M., Butler, S.R., & Suskind, M.R. (1978). Maternal behavior as a regulator of polyamine biosynthesis in brain and heart of the developing rat pup. *Science, 199*, 445-447.

Schertel, B., & Eichler, W. (1991). Polyamine biosynthesis in arginine-starved and refed rats. *Biological Chemistry Hopper-Seyler, 372*, 27-33.

Seiler, N. (2004). Catabolism of polyamines. *Amino Acids, 26*, 217-233.

Seiler, N., & Bolkenius, F. (1985). Polyamine reutilization and turnover in brain. *Neurochemistry Research, 10*, 529-544.

Shappell, N.W., Fogel-Petrovic, M.F., & Porter, C.W. (1993). Regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase by intracellular polyamine pools. *FEBS Letters, 321*, 179-183.

Sobotka, T.J., Cook, M.P., & Brodie, R.E. (1974). Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestation. *Brain Research, 65*, 443 - 457.

Tabor C.W., & Tabor H. (1984). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry, 53*, 749-790.

Wallace, H.M., Fraser, A.V., & Hughes, A. (2003). A perspective of polyamines metabolism. *Biochemical Journal, 376*, 1-14.

Wronska, D., Niezgoda, J., Sechman, A., & Bobek, S. (1990). Food deprivation suppresses stress-induced rise in catabolic hormones with a concomitant tendency to potentiate the increment of blood glucose. *Physiology & Behavior, 48*, 531-537.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo