

Paula Honório de Melo Martimiano

Etude de l'impact à court et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral

Estudo do impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do triptofano cerebral.

Nantes/Recife

2016

Paula Honório de Melo Martimiano

Etude de l'impact à court et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral

Estudo do impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do triptofano cerebral.

Thèse présentée à l'Université de Nantes (UN) / France en cotutelle avec le programme d'études supérieures en neuropsychiatrie et sciences du comportement, Université fédérale de Pernambuco (UFPE), pour obtenir le doctorat en neurosciences titre UFPE et un doctorat en Biologie et Santé par l'UN.

Tese apresentada a Universidade de Nantes (UN)/França em cotutela com o Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), para obtenção do título de Doutor em Neurociências pela UFPE e Doutor em Biologie et Santé pela UN.

Directeurs de thèse français: Dr. Francisco Bolaños-Jiménez

Directeurs de thèse brésilien: Raul Manhães de Castro

Co directrice brésilienne: Sandra Lopes de Souza

Co directeur français: Dr. Bertrand Kaeffer

Nantes/Recife

2016

M378e Martimiano, Paula Honório de Melo.
 Etude de l'impact à court et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral = Estudo do impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do triptofano cerebral / Paula Honório de Melo Martimiano. – 2016.
 221 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadores: Francisco Balaños-Ximenes; Raul Manhães de Castro.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2016.

Tese apresentada em língua francesa e portuguesa, à Université de Nantes (UN)/França em cotutela com o Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), para obtenção do título de Doutor em Neurociências pela UFPE e Doutor em Biologie et Santé pela UN.

Inclui referências e anexos.

1. Sistema nervoso central. 2. Triptofano. 3. Serotonina. 4. Programação metabólica. 4. Kynurenine. I. Balaños-Ximenes, Francisco (Orientador). II. Castro, Raul Manhães de (Orientador). III. Título.

612.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2016-139)

Paula Honório de Melo Martimiano

Etude de l'impact à court et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral

Estudo do impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do triptofano cerebral.

GUEANT Jean-Louis, Professeur des Universités, Université de Lorraine

PIROLA Luciano, Chargé de Recherche de 1^{er} Classe. Carmen Institute, INSERM U1060

OUGUERRAM Khadija, Professeur des Universités, Université de Nantes

FONTENELLE ARAUJO John, Professeur de l'université Rio Grande do Norte.

BOLAÑOS-JIMÉNEZ Francisco, Institut National de Recherche Agronomique

Bertrand KAEFFER, Chargé de Recherche de 1^{er} Classe. UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRA-Université de Nantes.

MANHÃES DE CASTRO Raul, Professeur de l'Université Fédérale de Pernambuco

Nantes/Recife

2016

AOS MEUS PAIS, Argeu e tereza

Essa é mais uma conquista dedicada a vocês. Vocês que me propiciaram uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca é uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só depende de nossa vontade. Tento retribuir o amor que vocês me deram com o melhor que consigo e faço o possível para deixá-los orgulhosos. Apesar da vida não ser fácil para nós, tentemos olhar sempre o lado positivo e sorrir para as coisas boas que nos cercam. Aprendi com minha mãe que é sempre preciso ter fé e com meu pai que a dedicação e confiança nos impulsionam. Levo isso no coração.

A vida passa rápido, espero tê-los sempre ao meu lado.

Minha maior felicidade em ter concluído o doutorado é ver o sorriso no rosto de vocês dois. Esse é um momento feliz!

Amo vocês, obrigada por tudo, painho e mainha.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

RAUL MANHÃES DE CASTRO

Obrigada por toda ajuda e atenção dada nesses quatro anos de doutorado. Pela competência científica e orientação dada, e que me ensinou com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas. Também não posso deixar de agradecer a oportunidade que me deste de ter ido à França realizar parte da tese, fato que me engrandeceu pessoalmente e profissionalmente.

DR. FRANCISCO BOLAÑOS-JIMENEZ

Je vous remercie pour toute son aide et pour m'avait accepté au sein de votre équipe. Merci pour tous les enseignements. Merci pour toutes les heures qui vous avez consacrées à diriger cette recherche.

RENATA CAMPINA E ANDRÉ OLIVEIRA

Muito obrigada pela ajuda em todas as fases dessa tese. Desde a escrita do projeto, dos experimentos na França e no Brasil, até o desenvolvimento da versão final da tese. Aprendemos juntos muitas coisas em Nantes e foi um prazer poder ter compartilhado momentos inesquecíveis ao lado de vocês.

AGRADECIMENTOS

À **Sandra Lopes de Souza** , pela ajuda, pela inspiração, pela preocupação. Você é uma grande líder e orientadora.

À **Larissa Almeida**, pela sua atmosfera. Pelas suas palavras profundas, sempre ditas com tanta força, vontade e certeza. Por juntar todas nós, amigas, segurar nossas mãos e repetir quantas vezes fosse preciso: “Nós vamos conseguir”. E eu consegui, Lara! Muito Obrigada.

À **Natália**, que me ajudou na obtenção e cuidado com os animais no departamento de nutrição.

Aos **professores, estagiários, mestrandos e doutorandos** do grupo de pesquisa Nutrição, Atividade Física e Plasticidade e do antigo NNI.

À **Edeones França** pelo cuidado com os animais

Às **secretárias e à chefia** da Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Ao **CNPq/CAPES/Ciências sem fronteiras** pelo apoio financeiro.

REMERCIEMENTS

Dr. Bertrand Kaeffer, pour l'intérêt dont il a fait preuve envers ma recherche, les moyens qu'il a mis en œuvre pour me donner accès au terrain ainsi que pour son accueil enthousiaste à chaque fois que je l'ai rencontré. Merci pour nos nombreuses discussions et la confiance qu'il a manifestée à l'égard de mon travail.

Dominique Darmaun, merci beaucoup pour m'avoir reçu dans votre laboratoire de recherche.

Mme. Khadija Ouguerram, Ms. Jean-Louis Gueant, Mme Anne Gabory, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Omar et Gina, Merci pour m'aider au cours de mes expériences.

Aurélié, Aurore, Fanny, Axel, Camille, Jacob, Laure, Omar, Morganne, Caroline, Angèle, merci pour vos compagnies dans le labo et surtout hors labo!

Blandine et Guillaume! Merci pour toute l'aide avec les animaux et pour faire les expériences, des moments agréables et heureux.

Armelle et Evelyne merci beaucoup pour toutes les aides avec les démarches administratives.

Agnès, Anthony, Christian, Isabelle Grit, Jean-Pierre, Patricia, Pierre, Gwenola, Clair-Yves, Thomas, Valérie, merci beaucoup pour les rigolades, pour les aides scientifiques ou seulement pour le bonne humeur apporter au labo.

Résumé

La dénutrition périnatale prédispose le nouveau-né au développement des maladies métaboliques et des déficits cognitifs. Cependant, il existe très peu d'informations sur la relation cause-effet entre le manque d'un, ou de plusieurs nutriments, pendant les étapes critiques du développement et la susceptibilité pathologique à l'âge adulte. L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'impact à court terme et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du tryptophane (Trp) cérébral. Le Trp est un acide aminé essentiel qui est métabolisé en sérotonine (5-HT) et, via la voie de la kynurénine (KYN), en de nombreux autres composés neuro-actifs dont l'acide kynurénique (KA) et l'acide xanthurénique (Xa). L'analyse quantitative par spectrométrie de masse des voies métaboliques du Trp, a montré que la restriction en apports protéiques chez la mère entraîne une diminution importante de la concentration de Trp, de 5-HT et des métabolites du Trp issus de la KYN dans les cerveaux des embryons. En revanche, les rats adultes nés et allaités par des mères dénutries, présentent une augmentation de la concentration cérébrale de Trp, de 5-HT, de KYN et de Xa. Il n'y avait pas de modification des métabolites du Trp chez les animaux de deuxième génération. Ces résultats montrent que la dénutrition périnatale provoque des altérations à court terme et à long terme dans le métabolisme cérébral du Trp, mais qu'elles ne sont pas transmises à la deuxième génération.

Mots-clés: Programmation métabolique. Système Nerveux Central. Tryptophane. Sérotonine. Kynurénine.

Resumo

A desnutrição perinatal predispõe o recém-nascido ao desenvolvimento de doenças metabólicas e défices cognitivos que podem ser transmitidas para a segunda geração. No entanto, há muito pouca informação sobre a relação causa-efeito entre a falta de um ou mais nutrientes durante estágios críticos de desenvolvimento e susceptibilidade à doença em curto e longo prazo. O objetivo dessa tese foi estudar o impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do triptofano (Trp) cerebral. O Trp é um aminoácido essencial que é metabolizado em serotonina (5-HT) e através da via da quinurenina (KYN) em muitos outros compostos neuroativos como o ácido quinurênico (KA) e o ácido xanturênico (Xa). A análise quantitativa por espectrometria de massa das vias metabólicas de Trp mostrou que a restrição da ingestão de proteína na mãe resulta numa diminuição significativa na concentração de Trp, 5-HT e metabólitos da KYN em cérebros de embriões. Em contraste, ratos adultos nascidos e alimentados por mães desnutridas, exibem um aumento na concentração cerebral de Trp, 5-HT, KYN e Xa. Não houve modificação nos metabólitos do Trp nos animais de segunda geração. Estes resultados mostram que a desnutrição perinatal provoca alterações em curto e longo prazo no metabolismo cerebral do Trp, porém que não são transmitidas para a segunda geração.

Palavras-chave: Programação metabólica. Sistema Nervoso Central. Triptofano. Serotonina. Kynurenine.

Abstract

The offspring of malnourished dams are at a high risk of developing metabolic diseases and cognitive deficits at adulthood that can be transmitted to the second generation. However, there is very little information on the cause-effect relationship between the lack of one, or of several nutrients, during the critical stages of development and disease susceptibility later in life. The objective of this thesis was to determine the impact of the perinatal malnutrition in the short and long-term on brain tryptophan metabolism. Tryptophan is an essential amino acid which is metabolized to serotonin (5-HT) and, through the kynurenine (KYN) pathway, in many other neuro-active compounds including kynurenic (KA) and Xanthurenic (Xa) acids. Quantitative analysis by mass spectrometry of the metabolic pathways of Trp, shown that maternal protein-restriction results in a significant decrease in the concentration of Trp, 5-HT and of all Trp metabolites issued from the KYN pathway in the brains of the embryos. In contrast, adult rats born to and breast-fed by protein-restricted dams, exhibit increased brain concentration of Trp, 5-HT, KYN and Xa. There was no change in the Trp metabolites in second-generation animals. These results show that perinatal malnutrition causes changes in short- and long-term in cerebral Trp metabolism, but that are not transmitted to the second generation.

Keywords: Programmation métabolique. Central Nervous System. Tryptophan. Serotonin. Kynurenine.

Liste des Figures / Lista de Ilustrações

Rappel Bibliographique

Figure 1. Schéma de la synthèse de la sérotonine à partir du tryptophane. Deux enzymes interviennent, le tryptophane hydroxylase et l'aminoacide aromatique descarboxylase.

Figure 2. Projections sérotoninergiques dans le cerveau humain à partir du noyau de la raphe.

Figure 3. Représentation schématique des contributions endogènes et exogènes de 5-HT en différents âges embryonnaires chez des rats *Pet1*^{-/-} en comparaison avec des rats sauvages.

Figure 4. Nouveau modèle de contribution de sérotonine pour le cerveau fœtal. Le placenta synthétise 5-HT et 5-HTP à partir du tryptophane maternel et sert comme source de 5-HT pour le *forebrain* durant la phase initiale de développement (E10 à E15).

Figure 5. Structure chimique du tryptophane.

Figure 6. Schéma des diverses fonctions du tryptophane en différents tissus.

Figure 7. Synthèse de la voie métabolique de la kynurénine.

Figure 8. Mécanisme potentiel de programmation transgénérationnelle. Voie maternelle (rose) et voie paternelle (bleu).

Revisão bibliográfica

Figura 1. Esquema da síntese de serotonina a partir do triptofano. Duas enzimas são envolvidas, a triptofano hidroxilase e aminoácido aromático descarboxilase.

Figura 2. Projeções serotoninérgicas no cérebro humano partindo do núcleo da rafe.

Figura 3. Representação esquemática das contribuições endógenas e exógenas de 5-HT em diferentes idades embrionárias em ratos *Pet1*^{-/-} em comparação com os selvagens.

Figura 4. Novo modelo de contribuição de serotonina para o cérebro fetal. A placenta sintetiza 5-HT e 5-HTP a partir do triptofano materno e serve como fonte de 5-HT para o *forebrain* durante a fase inicial de desenvolvimento (E10 a E15).

Figura 5. Estrutura química do triptofano.

Figura 6. Esquema das diversas funções do triptofano em diferentes tecidos.

Figura 7. Síntese da via metabólica da quinurenina.

Figura 8. Potencial mecanismo de programação transgeracional. Via materna (rosa) e via paterna (azul).

Résultats

Article 1 - Maternal protein-restriction induces selective and opposite changes on kynurenine pathway metabolism in the offspring's foetal and adult brain.

Figure 1 Schematic illustration of tryptophan metabolism through the serotonin and kynurenine pathways. The metabolites quantified in the present study are presented in shady boxes. TPH = Tryptophan hydroxylase; AAAD = Aromatic L-amino acid decarboxylase; MAO = Monoamine oxidase; IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO = Tryptophan 2,3-dioxygenase; KAT = Kynurenine amino transferase; KMO = kynurenine 3-monooxygenase; 3-HAO = 3- Hydroxyanthranilic acid oxygenase; Quinolinic acid phosphoribosyltransferase.

Figure 2 Concentration of kynurenine pathway metabolites in plasma from control and protein-restricted pregnant rats at gestational day 13 (A) and gestational day 17 (B). $p^* < 0.05$; $**p < 0.01$ compared with the concentration in plasma from control animals.

Figure 3 Impact of maternal protein-restriction on tryptophan metabolism through the serotonin (A) and kynurenine (B) pathways in the brain of the offspring at adulthood. The concentration of the different metabolites was determined by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry using brain samples from 7-month-old rats born to control or protein-restricted dams and fed standard chow since weaning. $p^* < 0.05$; $**p < 0.01$ compared with the concentration in control animals.

Figure 4 Impact of maternal protein-restriction on the expression levels in the embryonic (A) and adult brain (B) of the genes encoding for key enzymes of tryptophan metabolism through the serotonin (TPH2) and kynurenine (IDO, KMO), pathways. Fold changes in gene expression were calculated by dividing the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ value of each sample by the averaged $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the respective control group. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$ compared with control animals.

Résultats supplémentaires

Figure 9. Analyse quantitative de la voie métabolique de la sérotonine à partir du tryptophane dans le cortex (a), l'hippocampe (b), et la voie métabolique de la kynurénine à partir du tryptophane dans le cortex (c) et l'hippocampe (d) des animaux de deuxième génération. Les données ont été analysées par le test *t-student*

Figure 10. Gain de poids des animaux de première génération au cours de la lactation et après sevrage (b). Gain de poids des animaux de deuxième génération au cours de la lactation (c) et après sevrage (d). Les données ont été analysées par *two-way ANOVA* suivi du test de *Bonferroni*. Moyenne $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$.

Figure 11. Consommation d'aliment hypercalorique d'animaux de deuxième génération durant 10 jours consécutifs d'observation de jour (a) et de nuit (b). Les données sont exprimées en (Kcal/kg de poids)x100. Poids du tissu adipeux en gramme (c). Moyenne $\pm$ SEM. Les données ont été analysées par *two-way ANOVA* suivi du test de *Bonferroni*. Groupe contrôle, n=6 et groupe dénutri, n=5.

Figure 12. Poids absolu en grammes des animaux de première génération F1 (a). Poids du tissu adipeux des animaux de première génération F1 (b). (c) Test de tolérance au glucose des animaux de première génération F1. Poids absolu en grammes des animaux de deuxième génération F2 (d). Poids du tissu adipeux des animaux de deuxième génération F2 (e). Test de tolérance au glucose des animaux de deuxième génération F2 (f). Les données ont été analysées par *two-way ANOVA* suivi du test de *Bonferroni* pour le test de tolérance au glucose et pour le test *t-student* pour l'évaluation du poids corporel et du tissu adipeux. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$. * $P < 0,05$.

Resultados suplementares

Figura 9. Análise quantitativa da via metabólica da serotonina a partir do triptofano no córtex (a), hipocampo (b) e via metabólica da quinurenina a partir do triptofano no córtex (c) e hipocampo (d) de animais da segunda geração. Os dados foram analisados pelo teste *t-student*.

Figura 10. Ganho de peso dos animais da primeira geração durante a lactação (a) e após o desmame (b). Ganho de peso dos animais da segunda geração durante a lactação (c) e após o desmame (d). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Média $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$.

Figura 11. Consumo de alimento hipercalórico de animais da segunda geração durante 10 dias consecutivos de observação durante o dia (a) e a noite (b). Peso do tecido adiposo dos animais da geração F2 expostos à dieta hipercalórica (c). Os dados são expressos em (Kcal/kg de peso)x100. Média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido de Bonferroni test. Grupo controle, n=6 e grupo desnutrido, n=5.

Figura 12. Peso absoluto em gramas dos animais da geração F1 (a). Peso do tecido adiposo dos animais da geração F1 (b). (c) Teste de tolerância à glicose dos animais da geração F1. Peso absoluto em gramas dos animais da geração F2 (d). Peso do tecido adiposo dos animais da geração F2 (e). Teste de tolerância à glicose dos animais da geração F2 (f). Os dados foram analisados por *Two-way ANOVA* seguido de *Bonferroni test* para o teste de tolerância à glicose e pelo teste *t-student* para avaliação do peso corporal e tecido adiposo. Os dados são expressos em Média $\pm$ SEM. ** P <0,01. *P<0,05.

Liste des Tableaux / Lista de Tabelas

Métodos

Tabela 1. Ingredientes das dietas Controle e hipoproteica

Tabela 2 Parâmetros de ionização no modo positivo (ESI +) para o método espectrometria de massa.

Méthodes

Tableau 1. Ingrédients des diètes Contrôle et hypoprotéiques.

Tableau 2. Paramètres d'ionisation sur le mode positif (ESI +) pour la méthode spectrométrique de masse.

Résultats

Article 1 - Maternal protein-restriction induces selective changes in tryptophan metabolism in the brain embryo which are opposite to those observed in adult animals born to and nursed by protein-restricted dams

Table 1. Parameters in the positive ionization mode (ESI +) for mass spectrometric method.

Liste des abréviations et sigles / Lista de abreviações e siglas

	Português	Francês
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase	Aminoacide aromatique descarboxylase
AA	Ácido antranilínico	Acide antranilinique
ACMS	Ácido 2-amino-3- carboximuconico 6- semialdeído	Acide 2-amino-3- carboxymuconique 6- semialdéide
AMPA	Ácido alfa-Amino-3- hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico	Acide alfa-amino-3- hydroxy-5-méthyl-4- isoxazol propionique
AgRP	Peptídeo relacionado ao Agouti	Peptide relié à l'agouti
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
CSF	líquido cefalorraquidiano	Liquide céphalorachidien
DOHaD	Origens desenvolvimentistas da saúde e doença	Origines liées au développement de la santé et de la maladie
GPR35	35 Receptor acoplado a proteína G	Récepteur 35 couplé à la protéine G
HPA	Eixo hipotalâmico- pituitário-supra-renal	Axe hypothalamique- pituitaire-supra-rénal
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana	Virus de l'immunodéficience humaine - SIDA
IDO	indoleamina 2,3- dioxigenase	Indoléamine 2,3- dioxygénase
INF γ	Interferon γ	Interféron Y
IU	Intrauterina	Intra-utérine
KA	Ácido quinurênico	Acide kynurénique
KAT	Quinurenina amino- transferase	Kynurénine amino- transférase
KMO	Kynurenine 3- monooxygenase	Kynurénine 3-mono- oxygénase
KYN	Quinurenina	Kynurénine
KYNU	Quinureninase	Kynuréninase
LTP	Potenciação de longo- prazo	Potentiation à long terme
MAO	Monoamina oxidase	Monoamine oxydase
MCP-1	Proteína quimiotática de	Protéine chimiotactique de

NAD	monócitos 1 Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado	monocytes 1 Dinucléotide de nicotinamide et adénine oxydé
NMDA	N-metil-D-aspartato	N-méthyl-D-aspartate
NPY	Neuropeptídio Y	Neuropeptide Y
PCPA	p-clorofenialanina	p-chlorophénylalanine
POMC	Pró-ópiomelanocortina	Pro-opiomélanocortine
QA	Ácido quinolínico	Acide kynolinique
QPRT	Fosforribosiltransferase quinolate	Phosphorribosiltransférase kynolate
SNC	Sistema Nervoso Central	Système nerveux central
TNFa.	Fator de necrose tumoral	Facteur de nécrose tumoral
TPH	Triptofano Hidroxilase	Tryptophane hydroxylase
Trp	Triptofano	Tryptophane
QA	Ácido quinolínico	Acide kynolinique
QPRT	Fosforribosiltransferase quinolate	Phosforribosiltransférase kynolate
XA-In	Quelatos com insulina	Chélates avec insuline
XA	Ácido xanturênico	Acide xanthorénique
3-HK	3-hidroxiquinurenina	3-hydroxykynurénine
3-HANA	Ácido 3-hidroxi-antranílico	Acide 3-hydroxy- antranilique
5-HT	Serotonina	Sérotonine
5-HTP	5-hidroxitriptofano	5-hydroxytryptophane
5-Hiaa	Ácido 5-hidroxi-indol- acético	Acide 5-hydroxy-indol- acétique

SOMMAIRE/SUMARIO

SOMMAIRE/ SUMÁRIO

1 Presentation	24
2 Rappel Bibliographique	28
2.1 Programmation et dénutrition périnatale	28
2.1.1 Hypothèses	28
2.1.2 Dénutrition périnatale	32
2.1.3 Le rôle du placenta	33
2.1.4 Dénutrition périnatale et cognition	34
2.1.5 Dénutrition protéique périnatale et métabolisme	37
2.2 Système sérotoninergique	40
2.2.1 Concept	40
2.2.2 Bref historique	41
2.2.3 Sérotonine et développement cérébral	42
2.2.4 Récepteurs sérotoninergiques	45
2.2.5 Source exogène de 5-HT	46
2.2.6 Système sérotoninergique et dénutrition maternelle	49
2.3 Métabolisme du tryptophane	52
2.3.1 Métabolisme de la kynurénine	57
2.3.2 Métabolites de la kynurénine et son rôle sur le métabolisme	59
2.3.3 Métabolites de la kynurénine et son rôle sur la cognition	61
2.3.4 Kynurénines et développement cérébral	67
2.4 Transmission transgénérationnelle de la programmation métabolique	69
2.4.1 Transmission par la ligne paternelle	70
2.4.2 Transmission par la ligne maternelle	71
2.4.2.1 Voies de transmission: altérations épigénétiques	72
2.4.2.2 Voies de transmission: Ooplasma	73
2.4.2.3 Voies de transmission: ambiance gestationnelle hostile	73
3 Objectifs	77
3.1 Objectifs général	78
3.2 Objectifs spécifiques	78
4 Méthode	79
4.1 Comité d'éthique	79

4.2 Animaux et diètes	79
4.3 Conception expérimentale	80
4.3.1 Obtention des embryons	80
4.3.2 Obtention des animaux de la première génération	80
4.3.3 Obtention des animaux de la deuxième génération	81
4.4 Manipulations expérimentales	81
4.4.1 Chromatographie liquide – Spectométrie de masse	81
4.4.2 Real-time quantitative reverse transcription-PCR	82
4.4.3 Test de tolérance au glucose	83
4.4.4 Prise alimentaire	83
4.4.5 Analyse de données.	83
5 Résultats	85
5.1 Article original	85
5.2 Résultats supplémentaires	114
6 Discussion générale	119
7 Perspectives	133
9 Resumo da tese em português	134
9.1 Apresentação	135
9.2 Revisão bibliográfica	139
9.2.1 Programação e desnutrição perinatal	139
9.2.1.1 Hipóteses	139
9.2.1.2 Desnutrição perinatal	143
9.2.1.3 O papel da placenta	144
9.2.2 Sistema serotoninérgico	145
9.2.2.1 Conceito	145
9.2.2.2 Breve histórico	146
9.2.2.3 Serotonina e desenvolvimento cerebral	148
9.2.2.5 Fonte exógena de 5-HT	150
9.2.2.6 Sistema serotoninérgico e desnutrição materna	153
9.2.3 Metabolismo do triptofano	156
9.2.3.1 Metabolismo da quinurenina	161
9.2.3.4 Quinureninas e desenvolvimento cerebral	163
9.2.4 Transmissão transgeracional da programação metabólica	164

9.3 Objetivos	168
9.3.1 Objetivo geral	168
9.3.2 Objetivos específicos	168
9.4. Métodos	170
9.4.1 Comitê de ética	170
9.4.2 Animais e dietas	170
9.4.3 Descrição das fases experimentais	171
9.4.3.1 Obtenção dos embriões	171
9.4.3.2 Obtenção dos animais de primeira geração	171
9.4.3.3 Obtenção dos animais de segunda geração	172
9.4.4 Experimentos	172
9.4.4.1 Cromatografia líquida – Espectometria de massa	172
9.4.4.2 Real-time quantitative reverse transcription-PCR	173
9.4.4.3 Teste de tolerância à glicose	174
9.4.4.4 Consumo alimentar	174
9.4.5 Análises de dados	175
9.5 Resultados	177
9.5.1 Artigo original	177
9.5.2 Resultados suplementares	177
9.6 Discussão geral	182
9.7 Perspectivas	196
Références bibliographiques	198

Présentation

1 Présentation

Il est déjà largement reconnu que la restriction d'un nutriment ou plus durant la période fœtale ou dans l'enfance, est un stimulant pour programmer la possibilité d'innombrables maladies chroniques dans la vie adulte. Ce genre de maladies comprend les métaboliques comme l'obésité, le diabète *mellitus*, les maladies cardiovasculaires et les pathologies d'ordre neurologique qui conduisent à un vaste préjudice cognitif. Cette théorie s'appuie sur des recherches expérimentales qui montrent que chez les animaux la dénutrition durant la gestation et la lactation peut produire divers phénomènes observés en études épidémiologiques, comme par exemple l'élévation de la pression artérielle, l'intolérance au glucose, ou encore un déficit de mémoire et d'apprentissage à long terme.

Pour expliquer cette corrélation, on a supposé qu'un organisme, s'il est soumis à un environnement pauvre en nutriments durant les périodes critiques de développement, modifie son métabolisme pour augmenter ses chances de survie. De cette façon, l'organisme se trouvera « programmé » pour se développer dans un environnement constamment pauvre en nutriments. Cependant, si après cette période cet organisme est exposé à un environnement nutritionnellement riche ou déséquilibré, l'incompatibilité entre son « programme » physiologique et les nouvelles conditions nutritionnelles rend cet organisme plus réceptif à l'apparition de maladies métaboliques dans la vie adulte.

Actuellement, un élément-clef de la programmation est l'existence d'effets transgénérationnels, par quoi une exposition maternelle à divers facteurs en début de vie peut affecter la santé non seulement de la première génération, mais aussi celle des générations à venir. Plusieurs études prospectives fournissent des preuves convaincantes que l'exposition maternelle peut avoir sur la santé de la descendance des effets permanents qui se perpétuent à travers des générations.

Les évidences suggèrent également que la dénutrition durant la gestation et la lactation interfère de façon permanente dans la morphologie et la physiologie du cerveau à l'âge adulte, provoquant l'émergence des neuropathologies et des perturbations cognitives qui lui sont associées. La dénutrition maternelle est responsable d'altérations structurelles dans l'hippocampe et le cortex cérébral, régions importantes pour l'apprentissage et la mémoire. Les études montrent que les enfants exposés à la dénutrition durant les périodes de haute fragilité présentent des perturbations cognitives comme des difficultés d'apprentissage.

Actuellement les études se sont remises à aborder les mécanismes par lesquels l'environnement précoce interfère dans les aspects cellulaires et physiologiques de l'organisme. Cependant toutes les observations expérimentales sont plus descriptives que mécanistes, dans la mesure où elles correspondent à des altérations fonctionnelles et structurales associées à la programmation nutritionnelle, mais ne fournissent pas d'informations sur la relation de cause à effet entre le manque d'un nutriment spécifique durant les stades critiques du développement, et la possibilité de développer des maladies en des phases postérieures de la vie.

Le tryptophane est un acide aminé essentiel acquis uniquement par la diète. Outre qu'il fait structurellement partie des protéines du corps, son métabolisme est responsable pour la formation de la sérotonine, de la kynurénine, et d'une série de métabolites intermédiaires neuroactifs comme l'acide kynurénique et l'acide xanthorénique, dans lesquels ses fonctions se répercutent aussi bien au niveau périphérique que dans le système nerveux central. Ces composants sont présentés comme agissant depuis les processus cellulaires nécessaires pour le développement normal du cerveau jusqu'à des fonctions physiologiques complexes dans l'organisme déjà formé, telles que le métabolisme énergétique, la cognition, le comportement, le sommeil et la gestation.

Comme la disponibilité du tryptophane dans l'organisme est étroitement liée à la quantité et à la qualité de la diète consommée, cette thèse a comme **questions conductrices** : La dénutrition maternelle programme-t-elle le métabolisme cérébral du Trp dans la phase embryonnaire du développement ? Ces altérations persistent-elles dans la vie adulte, et peuvent-elles être transmises à la deuxième génération ? Ainsi, l'**objectif général** de cette thèse a été d'étudier l'impact à court terme et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral. Les **objectifs spécifiques** furent les suivants :

- Effectuer une analyse quantitative des voies métaboliques du tryptophane dans le *forebrain* et l'*hindbrain* d'embryons contrôles et dénutris avec 13 et 17 jours de vie intra-utérine.
- Déterminer le niveau d'expression génique des enzymes IDO, TPH2 et KMO dans le *forebrain* et l'*hindbrain* d'embryons contrôles et dénutris avec 17 jours de vie intra-utérine.
- Quantifier les métabolites du tryptophane dans le tronc cérébral, l'hippocampe et le cortex pré-frontal d'animaux contrôles et dénutris de la première génération.

- Déterminer le niveau d'expression génique des enzymes IDO, TPH2 et KMO dans le cortex, le tronc cérébral et l'hippocampe d'animaux contrôles et dénutris de la première génération.
- Quantifier les métabolites du tryptophane dans l'hippocampe et le cortex pré-frontal d'animaux contrôles et dénutris de la deuxième génération.
- Tracer les caractéristiques phénotypiques et le profil métabolique des animaux adultes contrôles et dénutris de deuxième génération.

Notre **hypothèse** de travail est que la dénutrition protéique maternelle altère le métabolisme cérébral du Trp dans la phase embryonnaire du développement cérébral et que ces modifications persistent dans la phase adulte et peuvent être transmises à la deuxième génération.

Pour fournir des appuis théoriques à cette hypothèse, seront présentés dans la révision bibliographique des éléments du concept de programmation nutritionnelle, des altérations structurelles et fonctionnelles déjà observées en d'autres travaux avec la même thématique. Sera en outre effectuée la présentation détaillée du métabolisme complexe du tryptophane, de la voie métabolique de la sérotonine, de la kynurénine et de sa relation avec la dénutrition périnatale, de même que les aspects liés à la cognition et au métabolisme énergétique et la transmission transgénérationnelle de la programmation métabolique.

Une partie des résultats issus de ce travail est présentée sous forme d'article et une autre partie est rédigée comme résultats supplémentaires. Outre ces articles soumis à publication, les résultats de cette thèse furent présentés en congrès sous forme de résumés.

Il faut souligner que comme il s'agit d'une thèse en cotutelle avec l'Université Fédérale de Pernambuco (Brésil), la thèse sera présentée avec un résumé en portugais. De cette façon, les normes de soutenance et de concession du titre sont conformes à la convention de partenariat signée entre l'Université Fédérale de Pernambuco et l'Université de Nantes.

Rappel Bibliographique

2 Rappel Bibliographique

2.1 Programmation et dénutrition périnatale

2.1.1 Hypothèses

Un apport nutritionnel adéquat est nécessaire pour le bon développement et la croissance de l'organisme. Des études montrent la relation entre la situation nutritionnelle du fœtus ou du nouveau-né et l'état de santé de cet individu dans la vie adulte (Barker and Osmond, 1988; Barker, Winter et al. 1989). Un exemple en serait l'étude développée à Hertfordshire (Angleterre), où a été établie la corrélation entre le faible poids à la naissance et dans la première année de vie, et les taux élevés de mort par maladies cardiovasculaires à long terme (Barker, Winter et al. 1989). Ces études ont conduit au développement des hypothèses dites de l'origine fœtale, par quoi fut suggéré que les événements *in utero* altèrent de façon permanente la structure et la fonction des organes en développement, et par conséquent disposent cet organisme à l'apparition de maladies à l'avenir (Barker, 1995; Hales and Barker, 2001; Bellinger, Lilley et al. 2004; Gluckman, Cutfield et al. 2005).

En outre, les recherches montrent qu'il existe une relation entre l'environnement pré- et post-natal, où ces organismes qui furent exposés à un environnement intra-utérin nutritionnellement pauvre, et qui ont trouvé après la naissance un environnement riche en nutriments leur permettant un rapide gain de poids, connu également sous le nom de *catch-up*, ont démontré être les plus exposés aux maladies cardiovasculaires et métaboliques dans la vie adulte (Eriksson, Forsen et al. 1999). Diverses hypothèses ont surgi dans le but d'éclaircir la base biologique de l'association entre l'environnement périnatal et son reflet dans la vie adulte.

Le modèle initial fut nommé l'hypothèse de génotype ménager, proposée par Neel en 1962 (Neel, 1962). La base fondamentale de cette hypothèse suggère que, dans l'histoire de l'évolution, des gènes qui auraient promu le stockage des graisses de manière efficace, auraient des avantages évolutifs, parce qu'ils permettraient aux individus qui les possèderaient une survie en période de pénurie alimentaire prolongée. Ces génotypes seraient très avantageux dans les sociétés primitives, qui étaient exposées à des périodes de restriction alimentaire, permettant des dépôts efficaces de graisse, capables de garantir la survie dans ces phases de carence alimentaire. Dans les sociétés modernes, ces gènes seraient des inconvénients, parce qu'ils favoriseraient le stockage de graisse en préparation d'une famine

qui ne viendrait jamais, et le résultat de nos jours est une augmentation de l'expansion de l'obésité et du diabète (Neel, 1962). Si cette hypothèse était correcte, l'origine de ces maladies serait principalement génétique, et son incidence déterminée par l'hérédité, mais les études sur les interactions entre gène et environnement montrent que les effets purement génétiques, qui indépendent du milieu, n'ont pas de véritable corrélation biologique.

Face aux critiques subies par l'hypothèse de Neel, surgit par la suite l'hypothèse du phénotype ménager, proposée par Hales et Barker (Hales and Barker, 1992). Cette hypothèse présente comme argument que l'incidence de la maladie ne peut s'expliquer en termes génétiques, mais plutôt que le fœtus en développement s'adapterait à des conditions de faible apport nutritionnel en modifiant son métabolisme de façon à améliorer le rendement énergétique et à augmenter la capacité de stockage de l'énergie, lui garantissant ainsi sa survie. Et les auteurs ont ajouté que si par la suite il y avait une incompatibilité avec les environnements, comme par exemple une augmentation de l'apport nutritionnel dans la période post-natale, cet organisme pourrait présenter des altérations métaboliques qui conduiraient à des problèmes cardiovasculaires, à un diabète de type 2 et à l'obésité (Hales and Barker, 1992).

En parallèle aux études de Hales et Barker, à la même période, un groupe de chercheurs se concentra sur l'étude des effets de la diète utilisée pour des nouveau-nés prématurés avec différents résultats à long terme. Ces auteurs ont montré, à travers des études cliniques, l'influence des différents types de diète sur la croissance somatique libre, et le développement neuropsychomoteur, et ont proposé d'employer le terme de programmation dans ce contexte (Lucas, Brooke et al. 1990; Lucas, 1998). Ce terme se réfère au concept selon lequel une agression ou un stimulus appliqué dans une période critique ou vulnérable peut avoir des effets durables ou persistants sur la structure ou la fonction d'un organisme (Lucas, 1991). Ainsi le développement et la gravité de certaines conditions morbides dépendent-ils, outre la vulnérabilité génétique, de l'exposition à des facteurs environnementaux agressifs en périodes critiques de développement, comme dans la vie périnatale et dans l'enfance, considérées ainsi pour être des périodes de haute plasticité (Khazipov and Luhmann, 2006; Crews, He et al. 2007). Ce modèle fut largement accepté, mais trouva des limitations. Alors qu'il pouvait expliquer les conséquences individuelles du faible poids à la naissance, il n'expliquait pas comment la programmation agit sur les fœtus bien nourris, puisque la programmation peut également intervenir chez des individus ayant un poids élevé à

la naissance. En outre, cette hypothèse n'explique pas les altérations métaboliques qui arrivent en réponse à des variations de l'environnement fœtal et qui ne sont pas immédiatement nécessaires pour la survie de l'individu (Silveira, Maranhao et al. 2007).

Ces limitations entraînèrent des modifications du modèle proposé par Lucas (1991) et un autre paradigme de programmation surgit en 2004, suggéré par Gluckman et Hanson, qui montrèrent que la possibilité de réponse à un environnement hostile arrive sans que soit immédiate la nécessité du bénéfice, mais qu'elle est faite dans la perspective d'un environnement à venir. Ces réponses furent nommées : réponses adaptatives prédictives (Gluckman and Hanson, 2004). Un bon exemple de réponse adaptative prédictive apparaît dans le gros rat des prés : ses petits peuvent développer différentes épaisseurs de peau qui dépendent de la photopériode à laquelle est exposée la mère. C'est-à-dire que même si dans l'utérus les petits sont à une température constante, la réponse prédictive est stimulée par le rythme de la mélatonine maternelle avant la naissance (Lee, Spears et al. 1989). Encore que le nid, l'environnement post-natal à court terme, soit semblable à l'utérus, l'épaisseur du revêtement est ajusté avant la naissance pour un environnement à venir des semaines plus tard, quand les petits sortent du nid. C'est pourquoi le gros rat des prés a évolué avec une stratégie qui prévoie l'environnement à venir de ses petits, et a rendu permanentes les réponses adaptatives anticipant cet avenir. L'objectif majeur des réponses adaptatives prédictives est de permettre aux organismes en développement l'utilisation de leur capacité de plasticité pour établir un phénotype post-natal prévu adéquat, permettant une meilleure chance de survie pour une reproduction ultérieure une fois adulte, et préserver ainsi la continuité de l'espèce (Gluckman and Hanson, 2004).

Le terme de plasticité de développement, connu également comme plasticité phénotypique, est défini comme le phénomène selon lequel un génotype peut donner naissance à une gamme de différents états physiologiques ou morphologiques en réponse à différentes conditions environnementales durant le développement (West-Eberhard, 2005). Comme on l'a dit plus haut, si l'environnement post-natal correspond à ce qui est prévu, il y aura des conséquences minimales pour l'organisme, mais si l'environnement n'est pas compatible avec la prévision, la réponse prédictive en vient à être inadéquate et peut entraîner des conséquences sur la santé à long terme (Bateson, Barker et al. 2004). Le risque de maladies est alors le résultat du degré de concordance ou de contraste (*match or mismatch*) entre l'environnement prévu par l'individu durant la période de grande plasticité, et

l'environnement réel dans lequel l'individu aura à vivre à l'avenir (Gluckman and Hanson, 2004a). Pour illustrer cette relation, on peut analyser les conduites de certaines pratiques médicales qui recommandent de stimuler et de promouvoir la croissance du bébé qui tète ayant un faible poids, de façon à réduire les taux de mortalité et à préserver les aspects neurocognitifs. L'on sait pourtant qu'un rapide gain de poids (*catch up*) dans cette période est associé à la plus grande incidence de maladies cardiovasculaires dans la maturité (Singhal, Cole et al. 2004; Singhal, Cole et al. 2007). Les risques de maladies cardiovasculaires et d'obésité se trouvent d'une façon constante dans les groupes d'individus qui ont pris une grande augmentation de poids entre la naissance et l'âge scolaire ou la pré-adolescence, surtout chez ceux qui étaient petits ou qui avaient un faible poids à la naissance (Eriksson, Forsen et al. 2001; Bettiol, Sabbag Filho et al. 2007).

L'hypothèse proposée par Gluckman et Hanson fut essentielle pour la compréhension de la relation de l'environnement précoce avec les répercussions futures, et se distingue des précédentes parce qu'elle explique que les maladies chroniques ne sont pas programmées en soi, mais que la tendance pour le développement des maladies semble être programmée. Ils ajoutèrent encore qu'il existe certains facteurs qui doivent être pris en considération parce qu'ils affectent la croissance fœtale et qu'ils ne sont pas nécessairement liés à la nutrition. Un facteur particulier est le phénomène de la constriction maternelle, c'est-à-dire que la croissance fœtale est limitée par l'incapacité maternelle de réaliser l'accouchement vaginal. Le mécanisme sous-jacent à la constriction maternelle est mal compris, mais il peut inclure des limitations dans la vascularisation utérine et dans la fonction placentaire (Gluckman and Liggins, 1984; Gluckman, Morel et al. 1992). Un autre facteur intéressant est que les gènes paternels peuvent exercer différents effets sur le fœtus, comme par exemple le facteur de croissance paternelle, l'IGF-2, lequel se trouve silencieux chez la mère, et joue un rôle important dans la croissance fœtale (Haig and Graham, 1991; Godfrey, Robinson et al. 1996). L'âge de la mère est aussi un facteur qui peut affecter la croissance fœtale, et qui n'est pas lié à la nutrition. L'explication la plus reçue est que les mères jeunes donnent la priorité à l'utilisation de nutriments pour leur propre anabolisme et leur croissance (Wallace, Bourke et al. 2001). En outre, les auteurs constatent qu'il existe bien des événements qui arrivent durant le développement, et qui peuvent avoir un impact à long terme sans affecter le poids du fœtus à la naissance. Par exemple, lors de la famine hollandaise durant l'hiver 1944-45 (Dutch Winter Famine), des femmes qui mangeaient moins de 800 calories par jour au premier trimestre de leur grossesse, ont eu des bébés avec un poids normal à la naissance, mais qui

sont devenus obèses une fois adultes (Ravelli, Stein et al. 1976; Ravelli, van Der Meulen et al. 1999), démontrant que le terme de plasticité phénotypique ne se restreint pas seulement quand il est lié aux altérations de la croissance du fœtus, mais que c'est un processus qui accompagne les adaptations que produit chaque fœtus en réponse à l'environnement.

Devant cet exposé, l'ample vision du terme programmation nous permet d'analyser les innombrables interactions qui ont lieu durant le développement fœtal, et les variables touchant l'environnement dans l'enfance et l'adolescence, et par conséquent la meilleure façon d'aborder le problème est de se focaliser sur la perspective du cours de la vie et ses interactions avec l'histoire fœtale et néonatale. En outre, l'on sait que la période où ces événements influencent la vie à long terme, s'étend depuis la conception (et probablement la pré-implantation) (Kwong, Wild et al. 2000) jusqu'à l'enfance. En raison de ce composant post-natal, s'est effectué le changement du terme d'origine fœtale pour celui d'origine développementale de la santé et de la maladie, en anglais : *Developmental origins of health and disease* (DOHaD) (Gluckman, Cutfield et al. 2005), qui est tellement étudiée aujourd'hui.

Nombreux sont les modèles utilisés dans la science pour étudier les effets de l'environnement sur le développement fœtal. Des modèles animaux ont fourni des contributions directes pour la compréhension de cet événement, et ont suggéré que les conséquences de la programmation sont critiques pour la survie d'une vaste gamme d'espèces (Bertram and Hanson, 2001). La programmation a été démontrée chez les porcs, les brebis, les rats et les souris, elle peut intervenir dans les phases précoces et tardives de la gestation, de la lactation, et jusque dans la phase de pré-implantation (Kwong, Wild et al. 2000). Elle se trouve induite par la dénutrition périnatale, qu'elle soit calorique ou protéique, par l'hypernutrition, par une dysfonction dans la perfusion utéro-placentaire, par une exposition de la mère aux glycocorticoïdes ou au stress. Parmi ces causes, la dénutrition protéique périnatale a une grande importance parce qu'elle joue un rôle crucial dans le développement de divers organes, et qu'elle fait partie d'un grand problème de la santé publique dans le monde. Au long des quarante dernières années ses effets ont été démontrés chez les humains (Scrimshaw, Taylor et al. 1968; Winnicki 1969; Tonkiss, Galler et al. 1993) et chez les animaux (Dobbing, 1968).

2.1.2 La dénutrition périnatale

Le terme « dénutrition » signifie qu'un ou plusieurs nutriments essentiels sont absents dans l'organisme, ou présents mais en proportions inadéquates. Dans les études expérimentales, le modèle nutritionnel le plus utilisé pour promouvoir la restriction de la croissance fœtale est l'induction de la dénutrition par la réduction du contenu en protéine dans la diète maternelle (Desai, Crowther et al. 1996). L'extension de la restriction protéique maternelle, tant en quantité qu'en qualité, qui caractérise les diètes hypoprotéiques, produit divers effets sur le développement fœtal, et parmi les mécanismes par lesquels les altérations survenues dans l'environnement maternel peuvent être transmises au fœtus, le placenta joue un rôle important.

2.1.3 Le rôle du placenta

Le placenta représente un des mécanismes par lesquels les altérations survenues dans l'environnement maternel peuvent être transmises au fœtus. La capacité du placenta de fournir des substrats au fœtus va dépendre de la qualité de la placentation, de la taille du placenta, des exigences du propre placenta en nutriments, et de l'extension des adaptations maternelles durant la grossesse qui exige par exemple l'augmentation du débit cardiaque pour améliorer la perfusion placentaire (Harding, Piacentino et al. 2001). La perfusion placentaire réduite qui survient dans la pré-éclampsie est associée au retard de la croissance fœtale (Poston, 2006). Le placenta est aussi une source importante de signaux du système endocrinien. Bien que certaines hormones jouent un rôle dans la manutention de la grossesse, d'autres sont chargées de la modulation du taux de croissance dans la maturation du cerveau et d'autres organes du fœtus. La corticotropine par exemple joue un rôle important dans la maturation de l'axe hypothalamopituitaire-adrénal, et des poumons du fœtus.

On peut concevoir également que les déficits ou les déséquilibres dans la qualité ou la quantité de la nutrition maternelle puissent contribuer à la programmation simplement par la restriction de fourniture de substrat pour le fœtus. Au 14^{ème} jour et demi de gestation, des rates alimentées par une diète pauvre en protéines avaient des fœtus plus petits, mais la taille du placenta était identique à celui des contrôles, mais au 18^{ème} jour et demi, aussi bien le poids fœtal que celui du placenta furent réduits (Rutland, Latunde-Dada et al. 2007). On a observé également des altérations des vaisseaux sanguins placentaires (Rutland, Latunde-Dada et al. 2007). Une diète pauvre en protéines fut associée à une perturbation de l'expression de

cadherine et de p-caténine dans l'endotèle vasculaire. Ces molécules d'adhésion sont régulatrices de l'intégrité et de la perméabilité jonctionnelle du placenta (Dejana, 1996).

Une série d'études rapportées par Powell et Jansson a montré que l'expression de glucose placentaire et transporteurs d'acides aminés, et par conséquent la fourniture de substrats pour le fœtus, peuvent être modulées par l'état nutritionnel maternel. Jansson et al. (2006) ont rapporté que la faible ingestion de protéines chez les rats a réglé négativement un transporteur d'acides aminés, et ils ont suggéré que cet effet puisse être provoqué par de faibles concentrations d'insuline, de leptine et d'IGF-1 dans la circulation maternelle.

Divers systèmes de transport sont impliqués dans le transfert d'acides aminés à travers le placenta. Utilisant un modèle de restriction protéique dans la diète maternelle, des études récentes ont montré que le transport materno-fœtal de méthyl-amino-iso-butirate (un analogue de l'alanine) est régulé négativement *in vivo*, avec un impact sur la croissance fœtale, ce qui suggère que le transport perturbé d'acides aminés placentaires peut être la cause de la restriction de la croissance intra-utérine (Jansson, Pettersson et al. 2006). En outre, les activités du système A et du système L sont plus faibles en tissus isolés de placenta de femmes enceintes dénutries, affectant les niveaux d'acides aminés du fœtus (Jansson, Pettersson et al. 2006; Jansson and Powell, 2006; Lin, Liu et al. 2012).

Considérant l'importance du placenta dans l'échange materno-fœtal, et ses altérations dues à la dénutrition maternelle, nous allons maintenant, en nous fondant sur le concept du DOHaD, analyser une série d'études qui montrent les répercussions de la dénutrition protéique maternelle sur le fonctionnement du cerveau et de divers organes périphériques liés aux aspects cognitifs et métaboliques de l'organisme.

2.1.4 Dénutrition périnatale et cognition

Il est déjà bien établi dans la littérature que la dénutrition protéique maternelle induit des effets délétères sur les structures cérébrales (Soto-Moyano, Fernandez et al. 1999; King, Kemper et al. 2002; King, De Bassio et al. 2004). Quoique le manque de micronutriments comme les vitamines ou les minéraux puisse affecter la maturation cérébrale, les protéines semblent être un des macronutriments de majeure importance (Morgane, Mokler et al. 2002). Un fait important à considérer est que, comme les protéines ne traversent pas la barrière placentaire de façon significative, la valeur nutritive des protéines dans la diète réside essentiellement dans les acides aminés qui ont été absorbés dans le système digestif maternel.

L'omission d'un seul aminoacide essentiel dans la diète maternelle (méthionine, phénylalanine, arginine, lysine ou tryptophane) peut avoir sur le développement du cerveau du fœtus des effets nuisibles semblables à ceux produits par l'omission de protéines comme un tout (Zamenhof, 1991).

Des études montrent que la diète hypoprotéique durant les périodes critiques du développement entraîne la diminution de poids du cerveau des petits, particulièrement dans la période post-natale (de Souza, Fernandes et al.; Joshi, Shaikh et al. 2003; de Souza, Pacheco Lda et al. 2008). Ses effets délétères sont associés à une suite d'évènements qui s'étendent sur tout le développement du cerveau, y compris l'étape de la formation de cellules (neurogenèse et gliogenèse), la migration cellulaire, et tous les aspects de différenciation comme la myélinisation et la synaptogenèse (Debassio, Kemper et al. 1994; Lukoyanov and Andrade, 2000). Il a déjà été établi que la dénutrition périnatale interfère au moment du développement du gyrus denté (Debassio, Kemper et al. 1994; Debassio, Kemper et al. 1996) et dans la morphologie des cellules de l'hippocampe (Diaz-Cintra, Cintra et al. 1991). Elle affecte en outre la génération des cellules pyramidales (Cintra, Diaz-Cintra et al. 1990; Diaz-Cintra, Cintra et al. 1991; Garcia-Ruiz, Diaz-Cintra et al. 1993; Granados-Rojas, Serrano et al. 2002), elle induit une réduction dans la genèse des cellules granuleuses (Debassio, Kemper et al. 1994; Debassio, Kemper et al. 1996) et altère le nombre des interneurons GABA (Diaz-Cintra, Gonzalez-Maciel et al. 2007). Le processus de migration neuronale semble également être affecté, car les altérations dans la prolifération cellulaire peuvent modifier le temps que ces cellules mettent pour arriver à destination, sans recevoir correctement leurs stimuli, ce qui peut produire des altérations neurophysiologiques (Morgane, Mokler et al. 2002).

Ainsi les études suggèrent que quand l'agression nutritionnelle arrive durant la période critique de développement du système nerveux central (SNC), elle pourra nuire aux fonctions de ce système, principalement dans le développement cognitif (Morgane, Austin-LaFrance et al. 1992; Morgane, Mokler et al. 2002). De fait, des enfants exposés à la dénutrition dans la période périnatale manifestent des déficits cognitifs (Galler and Ramsey, 1989; Walker, Grantham-Mcgregor et al. 2000), dans l'apprentissage et la mémoire (Tonkiss and Galler, 1990; Fukuda, Francolin-Silva et al. 2002), ou bien ils manifestent aussi la capacité de développer des maladies psychiatriques comme la dépression (Brown, van Os et al. 2000; Costello, Worthman et al. 2007). En confirmation de ces données, des études expérimentales montrent que des rats dénutris durant la période de développement manifestent des altérations

du comportement social (Almeida, Tonkiss et al. 1996) et exploratoire (Almeida, Tonkiss et al. 1996), outre des déficits liés à la mémoire (Castro and Rudy, 1993; Cordoba, Arolfo et al. 1994). Fukuda et ses collaborateurs (Fukuda, Francolin-Silva et al. 2002) ont démontré que les animaux dénutris dans la période de lactation jusqu'à 49 jours après la naissance, ont eu des difficultés dans la consolidation des informations spatiales (apprentissage spatial) acquises durant la phase d'entraînement d'un test appelé le Labyrinthe aquatique de Morris (en anglais : *Morris water maze*) (Redish and Touretzky, 1998; de Hoz, Martin et al. 2004). Benton (Benton, 2010) a observé qu'une déficience fœtale et néonatale de protéine et de fer entraîne des déficits de mémoire. On ajoutera que des déficiences de vitamine B6 et B12 durant la période périnatale perturbent la structure et la fonction de l'hippocampe (Benton, 2010; Gueant, Caillerez-Fofou et al. 2013).

Des études réalisées sur la formation hippocampale de rats exposés à une privation protéique ont révélé que le nombre total de cellules sur la couche granulaire dans le gyrus denté et dans les CA1 et CA3 de l'hippocampe, a été également affecté, montrant une réduction de leur quantité (Lukoyanov and Andrade, 2000). Même après la réhabilitation nutritionnelle, on a observé une diminution du nombre des cellules granulaires de l'hippocampe de rats privés protéiquement dans la période prénatale, ce qui suggère que cette réduction fut irréversible (Debassio, Kemper et al. 1996). En contrepartie, bien que certaines études montrent une réduction dans le nombre total des synapses des fibres moussues dans le CA3 d'animaux dénutris, on a observé que ce dommage peut être réparé après la récupération nutritionnelle de ces animaux, ce qui suggère une réorganisation des fibres moussues dans l'hippocampe (Andrade, Castanheira-Vale et al. 1996).

De plus, des études ont rapporté que la dénutrition protéique périnatale nuit à l'élévation de puissance à long terme (LTP, en anglais : *long-term potentiation*), ce qui est une augmentation durable de la résistance synaptique induite par une stimulation de haute fréquence (Morgane, Austin-LaFrance et al. 1993) qui représente une base cellulaire importante pour l'apprentissage et la mémoire (Hernandez, Burgos et al. 2008). Il faut souligner que la formation de la LTP est régulée par des neurotrophines, comme par exemple le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (de l'anglais *Brain-derived neurotrophic factor* - BDNF (Lu and Figurov, 1997). Et des études rapportent que les concentrations de BDNF peuvent être affectées par le statut nutritionnel (Lee, Seroogy et al. 2002; Molteni, Barnard et al. 2002), comme on le voit dans l'étude de Wang et de ses collaborateurs (Wang and Xu,

2007) qui montre une diminution des niveaux de BDNF de l'hippocampe chez des rats protéiquement dénutris dans la période périnatale. Des altérations physiologiques, principalement des sous-champs de l'hippocampe CA3 et CA4, comme aussi des modifications dans les cellules granulaires du gyrus denté d'animaux dont les mères avaient été dénutries dans la période périnatale, ont été également trouvées, révélant des dommages dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Morgane, Austin-LaFrance et al. 1993; Lukoyanov and Andrade, 2000). En outre les effets de la dénutrition affectent la neurogenèse de la formation de l'hippocampe, principalement dans les cellules granulaires (Debassio, Kemper et al. 1996) et les cellules pyramidales (Morgane, Mokler et al. 2002).

Outre l'importance et l'intérêt des études sur l'impact de la dénutrition maternelle sur les aspects cognitifs, certaines maladies chroniques, qui sont considérées comme une épidémie dans l'actualité, comme par exemple les maladies métaboliques, méritent aussi suffisamment d'attention.

2.1.5 Dénutrition protéique périnatale et métabolisme

Dans le sud de l'Ecosse, une étude sur des humains incluant des hommes et des femmes, a recherché comment la diète maternelle durant la grossesse a eu une influence sur la pression artérielle des fils âgés de 40 ans (Campbell, Hall et al. 1996). Les auteurs ont mis en relation l'augmentation de la pression artérielle présente chez les fils, avec la réduction de la consommation de protéines et l'augmentation de la consommation de carbohydrates par la mère, associées à la réduction de la taille du placenta (Campbell, Hall et al. 1996). Ravelli et ses collaborateurs (1998) ont observé une corrélation entre la résistance à l'insuline et l'altération dans le métabolisme du glucose, chez des personnes qui sont nées de mères qui furent exposées à des périodes de grande restriction alimentaire (*Dutch famine*) (Ravelli, van der Meulen et al. 1998). Dans une autre étude, de jeunes adultes qui présentaient un faible poids à la naissance, avaient une plus grande accumulation de graisse abdominale, une plus grande glycémie et insulinémie à jeun, comparés à des jeunes gens de poids normal à la naissance (Brons, Jacobsen et al. 2012). Des personnes qui avaient présenté un retard de croissance intra-utérine ont évolué en réduisant le nombre de cellules dans des organes-clefs pour le métabolisme, comme les reins et le pancréas. Selon Brenner et Chertow (1993), l'hypertension artérielle serait initiée par la réduction du nombre de glomérules chez des personnes qui étaient passées par un retard de croissance intra-utérine, favorisant

l'hyperfiltration glomérulaire qui avait conduit au développement de sclérose glomérulaire, culminant avec l'augmentation de la pression artérielle (Brenner and Chertow, 1993).

Des recherches avec des expériences sur des animaux établissent un parallèle avec les résultats des études sur les humains. Il a été établi que des rats exposés à la diète hypoprotéique durant la période périnatale ont un temps de vie plus court (Aihie Sayer, Dunn et al. 2001), avec une réduction du poids des organes au sevrage et une moindre croissance corporelle (Desai, Crowther et al. 1996). Passos, Ramos et Moura (2000) ont observé que des animaux exposés à une diète pauvre en protéines durant la période périnatale présentaient un moindre poids au sevrage et gardaient ce phénotype à long terme (Passos, Ramos et al. 2000). En parallèle à ces découvertes, on a observé que ces animaux présentaient une réduction dans l'expression de l'hormone de croissance dans l'hypophyse au sevrage, et gardaient ce modèle durant la vie adulte (De Moura et al. 2007).

L'utilisation de diète hypoprotéique durant le développement se répercute sur le poids des reins des nouveau-nés et réduit de près de 30% le nombre de néphrons (Marchand and Langley-Evans, 2001), ce qui contribue potentiellement au développement de l'hypertension dans la vie adulte (Hinchliffe, Lynch et al. 1992; Mackenzie and Brenner, 1995; Langley-Evans, Sherman et al. 1999). En outre, un changement dans la pression artérielle semble aussi accompagner des perturbations du système rénine-angiotensine-aldostérone. Des études ont démontré l'activité élevée de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et une altération dans l'expression des récepteurs de l'angiotensine II (Sherman and Langley-Evans, 1998; Sherman and Langley-Evans, 2000; McMullen and Langley-Evans, 2005). Le traitement avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion en angiotensine et antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II semble contrer les effets de la diète maternelle pauvre en protéines sur la pression artérielle des animaux dénutris (Sherman and Langley-Evans, 2000).

On a noté que l'exposition à la diète hypoprotéique durant le développement fœtal provoque la réduction de la quantité de cellules beta du pancréas à la naissance, et la réduction de la sécrétion d'insuline à long terme, probablement en raison de la réduction de la prolifération cellulaire et de l'augmentation du nombre d'évènements apoptotiques des cellules pancréatiques, associées à la réduction de l'expression de l'IGF2 (Petrik, Reusens et al. 1999). Il a été établi que la restriction protéique maternelle entraîne une altération de la localisation de l'utilisation du glucose, outre la diminution de l'activité des enzymes régulatrices du métabolisme des carbohydrates (Burns, Desai et al. 1997; Desai, Byrne et al. 1997). Les

études suggèrent également que des rats exposés à une diète hypoprotéique ont une augmentation des niveaux de triglycérides hépatiques et une augmentation de l'expression des enzymes lipogéniques favorisant la synthèse des lipides après le sevrage. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'expression de ces enzymes puisse contribuer à l'augmentation des niveaux de triglycérides hépatiques, et que cette augmentation puisse prédisposer chez les petits une augmentation de la graisse viscérale, en augmentant la surface des apocites, ce qui aboutit à l'obésité et à la résistance à l'insuline (Bellinger, Sculley et al. 2006, Gosby et al. 2010).

Les études suggèrent également que la dénutrition dans les périodes critiques du développement puisse se répercuter sur le contrôle central du comportement alimentaire. Plagemann et al. (Plagemann, Harder et al. 2000), ont suggéré que des animaux exposés à une diète hypoprotéique dans la période périnatale ont eu des altérations dans l'expression des neuropeptides hypothalamiques liés au comportement alimentaire, à l'augmentation de l'expression du neuropeptide Y (NPY) et du peptide lié à l'agouti (AgRP) et une diminution de l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC) (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009), avec le métabolisme du glucose et des senseurs nutritionnels (Orozco-Solis, Matos et al. 2010).

Des répercussions de la diète pauvre en protéines durant la période de gestation et de lactation ont été également établies, et l'on a rapporté des altérations dans l'expression circadienne de certains gènes liés au métabolisme et à la consommation alimentaire (Matos, Orozco-Solis et al. 2011). Dans une étude expérimentale on a vérifié que la dénutrition protéique périnatale peut être engagée dans la préférence pour des aliments riches en graisse (Bellinger, Lilley et al. 2004). Quand est offerte l'option de choisir une nourriture avec une forte teneur en graisse, riche en protéines ou riche en carbohydrates, des animaux de 12 semaines d'âge, descendants de mères alimentées avec une diète pauvre en protéines durant la gestation, ont consommé de façon significative une nourriture riche en graisse et moins riche en carbohydrates, comparée aux animaux contrôles, ce qui suggère que la dénutrition périnatale stimule la préférence pour des aliments gras, et qui ainsi peuvent influencer les voies engagées dans le contrôle de l'appétit et dans la perception des saveurs chez la progéniture (Bellinger, Lilley et al. 2004; Bellinger and Langley-Evans, 2005). En outre il a été établi que des animaux dénutris dans la période périnatale ont développé une hyperphagie dans la période qui a suivi le sevrage (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008; Orozco-

Solis, Lopes de Souza et al. 2009) et ce fait a été associé à l'augmentation des niveaux de 5-HT cérébral et à la réduction de l'effet anorexigénique de la 5-HT à travers la désensibilisation du récepteur sérotoninergique 5-HT_{1B} (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008).

Le développement de la fonction de neurotransmetteurs a lieu durant la période de différenciation, à travers la synthèse des enzymes régulatrices et des récepteurs spécifiques. Aussi bien la période où a lieu la dénutrition, que sa durée, sont des facteurs critiques pour déterminer les effets sur le cerveau (Morgane, Mokler et al. 2002). Il y a des évidences que plus précoce est l'agression nutritionnelle, plus graves et permanents en sont les effets (Morgane, Austin-LaFrance et al. 1992). La privation de protéines affecte le nombre et la distribution des récepteurs et des neurotransmetteurs (Almeida, Tonkiss et al. 1996a), altérant les fonctions glutamatergique (Rotta, Schmidt et al. 2003), gabaergique, catécolaminergique et sérotoninergique (Wiggins, Fuller et al. 1984).

2.2 Système sérotoninergique

2.2.1 Concept

La 5-HT est un produit synthétisé à partir du précurseur Trp à travers l'action de deux enzymes. L'acide aminé Trp est hydroxylé par la tryptophane hydroxylase (TPH), donnant comme produit le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) (Clark et al. 1954). Dans la deuxième, le 5-HTP est descarboxylé par l'acide aminé aromatique descarboxylase (AADC), formant la 5-HT (CLARK et al. 1954) (figure 1). Des études pharmacologiques initiales ont montré que les réactions d'hydroxylation et de descarboxylation se produisent presque instantanément en présence du Trp (CLARK et al. 1954). La dégradation de la 5-HT s'effectue au moyen de l'action de la monoamine oxydase (MAO) (Sandler, Reveley et al. 1981), qui se distingue en MAO-A et MAO-B. La première est responsable de la métabolisation de la 5-HT encéphalique. La MAO-B agit primordialement sur la 5-HT périphérique (plaquettes et cellules entérochromaffines). La 5-HT est libérée par les vésicules dans la fissure synaptique où elle peut être liée à ses récepteurs spécifiques. Le mécanisme de recapture déplace la 5-HT de la fissure synaptique vers les neurones présynaptiques où elle est métabolisée en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA).

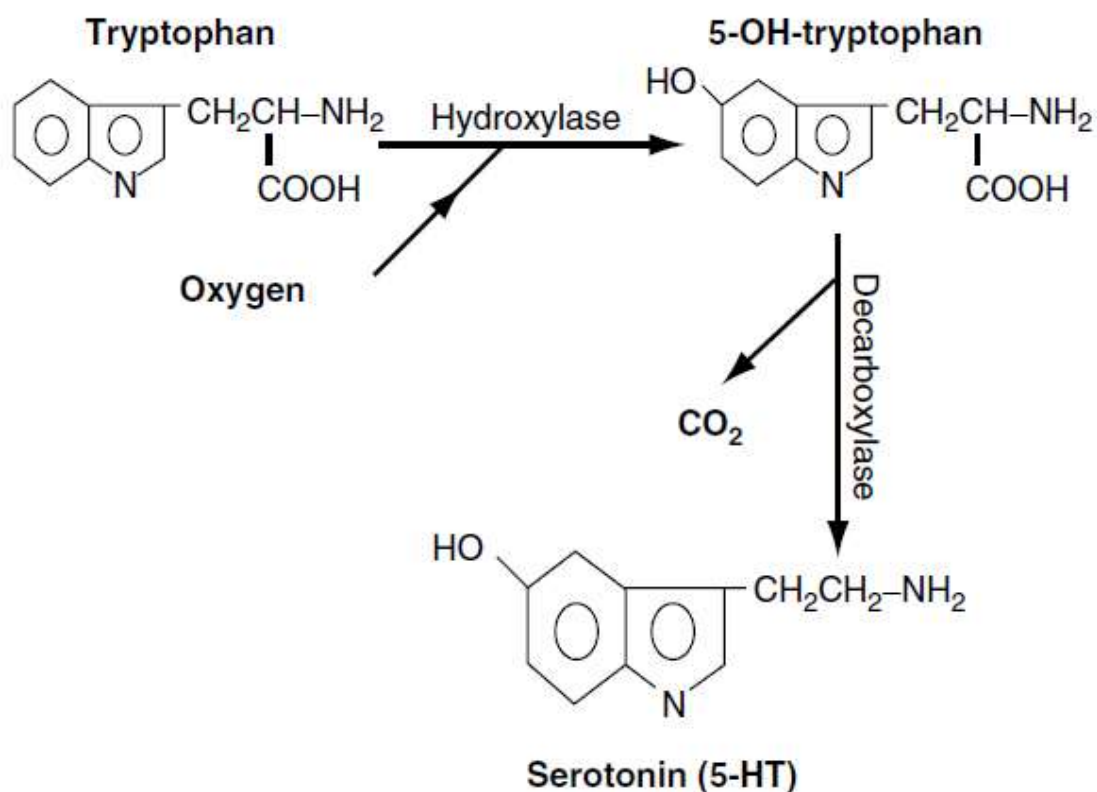


Figure 1. Schéma de la synthèse de la sérotonine à partir du tryptophane. Deux enzymes sont engagées, la tryptophane hydroxylase et l'acide aminé aromatique décarboxylase.

2.2.2 Bref historique

La 5-HT a été isolée et caractérisée en 1948 par Maurice Rapport et Irvine Page (Rapport et al. 1948). L'isolement de la 5-HT a été atteint après des décennies d'investigations qui avaient pour objectif de caractériser une substance vasoconstrictrice probablement présente en plaquette (Janeway, 1918; Zucker, 1944). Initialement, l'agrégation plaquettaire fut considérée comme son rôle principal dans le sang, elle pouvait jouer quelque fonction dans l'hémostase (Rapport, Green et al. 1948; Humphrey and Jaques, 1954).

Après la découverte de la 5-HT, beaucoup de chercheurs ont mené des études parallèles pour définir sa localisation et sa fonction. Au cours des soixante dernières années on a étudié la fonction de la 5-Ht sur le tonus vasculaire, sur les anomalies de la fonction vasculaire cérébrale et des fonctions cardiaques normales, comme la fréquence cardiaque, la contractilité et le débit cardiaque (Cote, Fligny et al. 2004). Le tonus vasculaire est particulièrement contrôlé par l'activation des récepteurs de 5-HT dans l'endothélium vasculaire et les cellules du muscle lisse (Yildiz, Ehlert et al. 1998; Nilsson, Longmore et al.

1999). La 5-HT a une fonction aussi bien contractive que dilatatrice, fondée sur le sous-type de récepteur et le lieu de l'action (Nilsson, Longmore et al. 1999). La fonction de la 5-HT a aussi été décrite dans les cellules intestinales (Peroutka 1994). Bulbring et Crema (1958) ont montré que la 5-HT stimule le pouement péristaltique et les réflexes sécréteurs intestinaux. La 5-HT est produite dans l'intestin par des cellules entérochromaffines et par les neurones des plexus mioentériques. Malgré son importance dans les organes et les systèmes périphériques, cette substance a surtout été décrite comme un neurotransmetteur, agissant au niveau cérébral.

La 5-HT a été détectée dans le cerveau en 1953 par Twarog et Page (Twarog and Page, 1953). Dahlstrom et Fuxe (Dahlstrom and Fuxe, 1964) ont été les premiers à établir la carte des noyaux spécifiques du cerveau qui contenaient 5-HT. Ce groupe de neurones est connu comme système sérotoninergique. A cette époque, 5-HT n'était que le troisième neurotransmetteur découvert. En 1957, Gaddum et Picarelli ont signalé l'existence de divers sous- types de récepteurs de 5-HT, et les ont nommés 5-HT-H et 5-HT-D. Peroutka et Snyder (Peroutka, Lebovitz et al. 1979) ont reclassé ces récepteurs en se fondant sur des études utilisant la méthode de radioliants. Par la suite, à la fin des années 1980 l'application de techniques de clonage moléculaire a révolutionné la découverte des protéines et a permis ainsi le clonage de 14 sous-types distincts de récepteurs de 5-HT (Pazos, Cortes et al. 1984). Aussi bien leur structure moléculaire que leurs propriétés pharmacologiques ont déterminé leur classement. Actuellement les récepteurs de 5-HT sont distribués en sept familles distinctes (Hoyer, Clarke et al. 1994). A travers ces récepteurs, la 5-HT est engagée en de multiples activités comportementales, incluant l'agressivité, le sommeil, l'alimentation, l'activité locomotrice, l'attention, l'apprentissage, la mémoire et l'activité sexuelle. Elle règle en outre certains mécanismes physiologiques comme la température, la respiration, le flux de sang et de coagulation, l'osmolarité et la sécrétion hormonale. L'organisation des neurones sérotoninergiques dans le cerveau en développement et déjà formé a été réexaminée sur une grande échelle (Azmitia, Buchan et al. 1978; Parent, 1981; Jacobs and Azmitia, 1992).

2.2.3 Sérotonine et développement cérébral

Les neurones sérotoninergiques font partie des systèmes neuronaux les plus amplement distribués dans le cerveau des mammifères. Avant son rôle comme neurotransmetteur vital dans le cerveau adulte, la 5-HT agissait comme régulateur du développement cérébral. Le cerveau immature produit excessivement de connexions et de

cellules. Mais elles sont élaguées selon leur niveau d'activité par des mécanismes apoptotiques guidés par les systèmes chimiques existants. Comme la 5-HT est présente plus précocement dans le développement que les autres systèmes de neurotransmetteurs, et étant donné que le taux d'utilisation de la 5-HT est plus élevé dans le cerveau des mammifères immatures qu'en quelque autre période (Hamon and Bourgoïn, 1979), la 5-HT joue probablement un rôle fondamental dans ce processus de développement du cerveau (révisé par Whitaker-Azmitia, 2001).

Il existe deux grands groupes de neurones sérotoninergiques qui apparaissent durant la période embryonnaire et semblent avoir des modèles distincts de maturation et de migration (Lidov and Molliver, 1982; Wallace and Lauder, 1983). Le groupe antérieur (noyau dorsal de la raphe, par exemple) se projette rostralement pour le *forebrain*, le thalamus et l'hypothalamus, tandis que le groupe de queue se projette caudalement et ventralement pour innervier respectivement la moelle épinière et la cervelle. Les neurones sérotoninergiques innervent presque toutes les aires du cerveau (Jacobs et Azmitia, 1992), leurs projections sont résumées sur la figure 2.

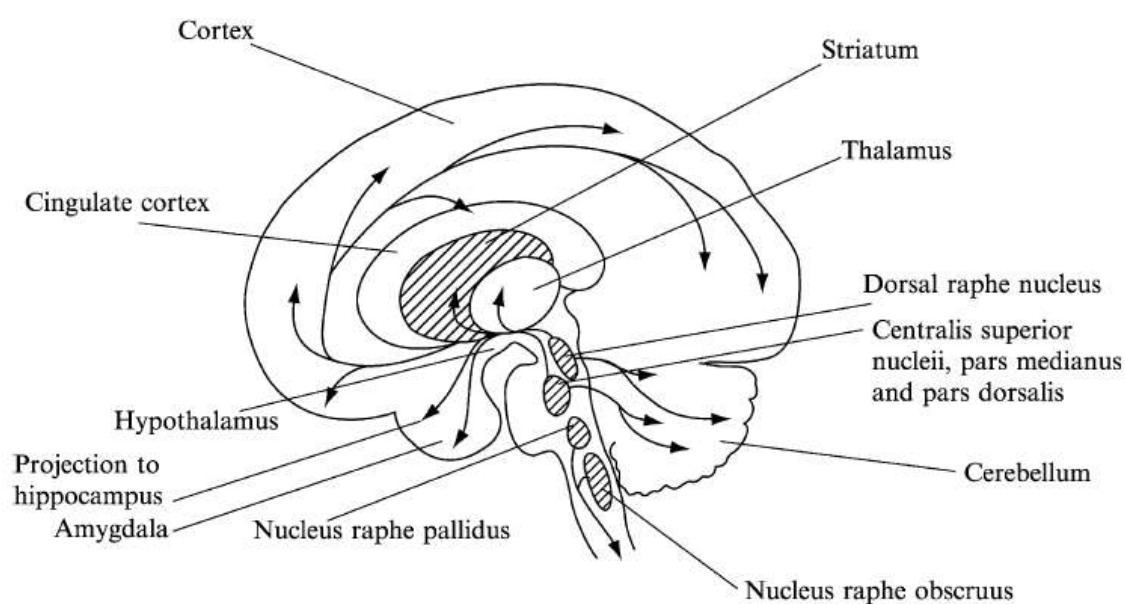


Figure 2. Projections sérotoninergiques dans le cerveau humain partant du noyau de la raphe.

Les plus hauts niveaux d'activité sérotoninergique sont détectés au début du développement (Lidov and Molliver, 1982). Dans l'être humain, les neurones sérotoninergiques peuvent être détectés quand l'embryon a à peine 5 semaines (Sundstrom,

Kolare et al. 1993), avec une croissance et une multiplication rapide jusqu'à la 10^{ème} semaine de gestation (Shen, Luo et al. 1989; Kontur, Leranth et al. 1993; Levallois, Valence et al. 1997). Après 15 semaines, le groupement des corps cellulaires sérotoninergiques est observé dans les noyaux de la raphe. La densité synaptique des systèmes des amines biogéniques dans le cortex cérébral humain double depuis la naissance jusqu'à l'âge d'un an, où il atteint son sommet, puis il diminue pour des niveaux qui restent fixes jusqu'à l'âge adulte (Huttenlocher and Dabholkar, 1997). De la même façon les niveaux de 5-HT augmentent durant les deux premières années après la naissance, et diminuent ensuite pour des niveaux qui restent fixes jusqu'à l'âge adulte (Hedner, Lundell et al. 1986; Toth and Fekete, 1986). Le début de l'arrivée du système sérotoninergique avant les autres monoaminées indique que la 5-HT peut être nécessaire pour guider le développement d'autres systèmes de neurotransmetteurs (Whitaker-Azmitia, Druse et al. 1996; Benes, Taylor et al. 2000). Un espace de temps équivalent pour le développement du système sérotoninergique a été observé chez les rongeurs (Rubenstein, 1998).

Chez le rat, les projections axonales des noyaux de la raphe rostrale montent jusqu'au mésencéphale et au *forebrain*, tandis que celles des noyaux caudaux descendent vers la moelle épinière (Wallace and Lauder, 1983). Les fibres descendantes entrent dans la moelle épinière au 14^{ème} jour embryonnaire (E 14) et inervent les neurones sympathiques pré-ganglionnaires et les neurones moteurs somatiques. Au 17^{ème} jour ils commencent à former des synapses et inervent les neurones de la corne dorsale. Les projections rostrales sont visibles immédiatement après que la 5-HT a été détectée dans le tronc cérébral. Les fibres non ramifiées croissent dans la zone marginale, comme un faisceau dans le *forebrain*, et vers le 17^{ème} jour elles atteignent le diencéphale, où elles se ramifient. Le 17^{ème} jour, les fibres moyennes du *forebrain* se projettent vers le télencéphale, tandis que les fibres latérales se projettent vers l'hypothalamus et arrivent à l'extrémité rostrale du cerveau. Il y a une entrée simultanée de fibres de 5-HT dans le télencéphale, la majorité entre par la bande de Broca, les aires du septum, et se projettent ensuite vers le cortex cérébral (Rubenstein, 1998).

Durant le développement cérébral les neurones sérotoninergiques sont influencés par des facteurs de croissance qui agissent sur la plasticité synaptique. Parmi eux comptent les niveaux du facteur de croissance astroglial et du *calcium-binding protein B*, qui sont augmentés en la présence de 5-HT et inhibés dans les terminaux sérotoninergiques. Se détache en outre la fonction du facteur neurotrophique dérivé du cerveau et ses récepteurs,

parmi bien d'autres molécules qui sont activées sous influence sérotoninergique (Herdegen and Leah, 1998). En outre, *Pet1*, un facteur de transcription, est intimement associé au développement des neurones sérotoninergiques dans les noyaux de la raphe. D'autres facteurs neurotrophiques et de croissance contrôlent la différenciation des neurones sérotoninergiques, incluant les protéines morphogénétiques osseuses et le facteur neurotrophique ciliaire (Hendricks, Francis et al. 1999). Le système de la 5-HT règle également sa différenciation par l'activation de différents types de récepteurs sérotoninergiques.

2.2.4 Récepteurs sérotoninergiques

Des évidences suggèrent que le récepteur 5-HT_{1A} est présent au début du développement cérébral et semble être engagé dans la régulation du développement du système sérotoninergique (Bar-Peled, Gross-Isseroff et al. 1991; Hillion, Milne-Edwards et al. 1993). 5-HT_{1A} est fonctionnel avant la naissance en raison de son expression dans le cerveau fœtal (Lauder et al. 2000; Whitaker-Azmitia et al. 1990). Chez les humains, l'expression de 5-HT_{1A} atteint son point culminant entre la 16^{ème} et la 22^{ème} semaine intra-utérine (Bar-Peled et al. 1991). Des recherches sur diverses régions du cerveau montrent que le niveau le plus élevé de l'expression de 5-HT_{1A} est atteint durant le développement de la région concernée et diminue après que la maturation a eu lieu. Ce phénomène a été rapporté sur le tronc cérébral (Hillion et al., 1993), sur le cervelet (Daval, Verge et al. 1987), et dans le cortex visuel (Dyck and Cynader, 1993). Les évidences indiquent que ce récepteur est engagé dans le développement de cellules de granules dentés, et il est probable qu'il joue aussi un rôle d'entretien de l'intégrité synaptique chez l'adulte (Wilson, Faber et al. 1998).

Outre cette forte évidence de son rôle de récepteur 5-HT_{1A} durant le développement, des données semblables ont été découvertes dans des recherches sur les récepteurs 5-HT₂. Comme cela se passe avec le récepteur 5-HT_{1A}, l'activité des récepteurs 5-HT₂ est augmentée dans les états critiques du développement du cerveau. Les niveaux de phosphate d'inositol médiatisé par 5-HT₂ sont près de dix fois plus élevés dans le cerveau en développement en comparaison avec un cerveau adulte. (Claustre, Rouquier et al. 1988). En outre, les études pharmacologiques de Niitsu et de ses collègues (Niitsu, Hamada et al. 1995) suggèrent que l'activité de récepteur 5-HT_{2A} règle la synaptogenèse dans l'embryon. Le 5-HT_{2A} provoque l'élan neuronal pour élever l'activité des récepteurs AMPA, et aussi pour augmenter les niveaux de calcium intercellulaire, qui augmentent l'activité métabolique de la

cellule. Il existe une augmentation de la glycogénèse, entraînant la prolifération des cellules. Les récepteurs 5-HT_{2C} permettent également les effets mitogéniques de 5-HT quand elle est exprimée en haute densité en fibroblastes (Julius, Livelli et al. 1989; Julius, Huang et al. 1990). C'est pourquoi l'activation des récepteurs 5-HT₂ influence l'apoptose et la croissance cellulaire. On a également montré que le récepteur 5-HT_{2A} influence le développement post-natal du cortex pré-frontal (Rakic and Goldman-Rakic, 1982). La période critique de développement pour le néocortex chez les rongeurs a lieu durant les deux premières semaines post-natales, qui sont également une période d'intense synaptogenèse, la densité synaptique augmente cinq fois entre les dix et les quinze premières semaines quand elle atteint presque le niveau du cerveau adulte (Micheva and Beaulieu, 1996). Le puissant effet d'excitation produit par la 5-HT durant cette période est modulé surtout par les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₇ (Zhang, 2003).

Comme les terminaux sérotoninergiques sont développés dans une région cible, et que ses récepteurs sont disponibles, la libération de 5-HT peut influencer la neurogenèse (Lauder and Krebs 1976; Lauder and Krebs, 1978), le transfert neuronal, le raffinement dendritique, la migration de cellules et la plasticité synaptique (Lauder, Wallace et al. 1981; Chubakov, Gromova et al. 1986; Lauder 1990; Chubakov, Tsyganova et al. 1993). Dans la phase tardive de développement, la 5-HT influence la croissance dendritique. Elle altère la longueur totale des dendrites, la formation des épines dendritiques, et les branches dans l'hippocampe et dans le cortex (Mazer, Muneyyirci et al. 1997; Faber and Haring, 1999). Outre ces divers facteurs cités plus haut qui contribuent au développement du système sérotoninergique durant la période embryonnaire, dans ces quarante dernières années les études ont établi l'existence de sources exogènes de 5-HT pour l'embryon durant la grossesse.

2.2.5 Source exogène de 5-HT

Les neurones sérotoninergiques apparaissent tôt dans le *hindbrain* fœtal et peuvent fournir une source endogène de 5-HT dans le cerveau. Mais des sources exogènes de 5-HT ont été suggérées, car on a observé que des récepteurs de 5-HT sont exprimés dans le *forebrain* rostral et craniofacial plusieurs jours avant le surgissement d'axones sérotoninergiques. Des recherches suggèrent qu'il existe de multiples sources de neurotransmetteurs, comme la 5-HT, durant le développement fœtal, y compris l'intestin fœtal et la circulation maternelle (Lauder, Wallace et al. 1981; Yavarone, Shuey et al. 1993).

Une étude récente a analysé les concentrations de 5-HT dans toute la période embryonnaire de différentes aires du cerveau des rats *Pet-1*^{-/-} (où 70-80% des neurones de la raphe ne synthétisent pas 5-HT) et des rats de type sauvage de la même nichée, afin d'établir une évidence directe sur la source exogène de 5-HT. On a observé une réduction drastique de 5-HT chez les rats *Pet-1*^{-/-} durant le développement fœtal. Toutefois en des âges précoces (de 10,5 à 15,5) les niveaux 5-HT se présentent normaux dans le *forebrain* des embryons *Pet-1*^{-/-} en comparaison des contrôles de la même nichée, et à partir de 16,5, la concentration de 5-HT se trouve réduite, temps qui correspond au moment où les axones qui sont originaires du noyau de la raphe atteignent le *forebrain* (Bonnin and Levitt, 2011). L'accumulation différentielle de 5-HT dans le *forebrain*, mais pas dans le *hindbrain* chez les embryons *Pet-1*^{-/-} en développement, indique qu'il y a une transition marquée d'une source exogène précoce à une endogène tardive de 5-HT (figure 3).

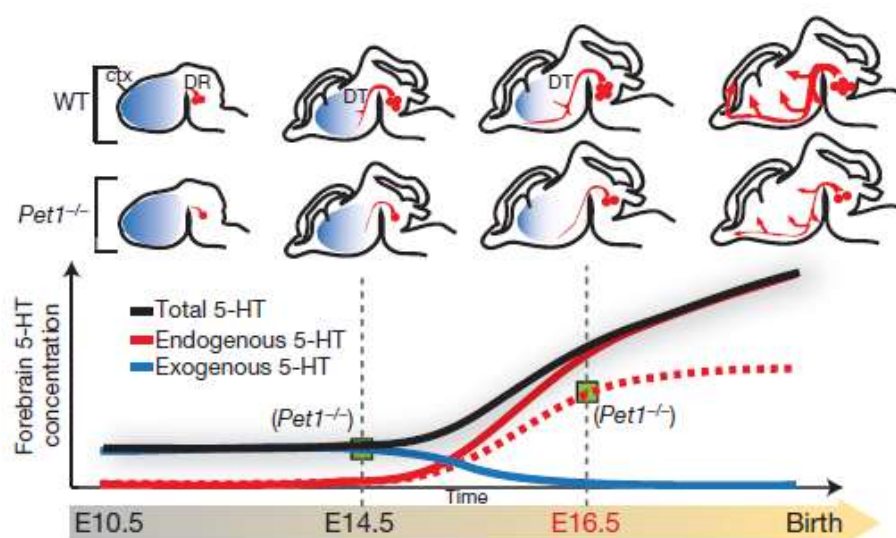


Figure 3. Représentation schématique des contributions endogènes et exogènes de 5-HT à différents âges embryonnaires chez des rats *Pet1*^{-/-} et des rats sauvages (Bonnin et al. 2011).

Certaines hypothèses ont été testées pour tenter d'identifier la source responsable de la production exogène de 5-HT dans les phases précoces du développement. Les auteurs ont montré dans une étude *ex vivo* la possibilité pour le précurseur et aminoacide essentiel Trp d'origine maternelle, d'être converti en 5-HT dans le placenta et envoyé dans la circulation fœtale (Bonnin et al. 2011). Quelques minutes après l'injection de Trp à travers l'artère utérine maternelle, l'on a observé une grande accumulation de 5-HT nouvellement

synthétisée, ce qui montre que le placenta est capable de convertir Trp en 5-HT et de le fournir à la circulation fœtale. Des études moléculaires et immunohistochimiques ont confirmé que les enzymes de biosynthèse de 5-HT sont exprimées dans le placenta au cours des périodes E10.5, E14.5, et E18.5. (Bonnin et al. 2011). Pour établir la capacité de synthèse placentaire et le transport de 5-HT pour le fœtus *in vivo*, Bonnin et al. ont bloqué l'activité enzymatique de la TPH1 par micro-injection de petits volumes de p- chlorophénylalanine (PCPA) directement dans le placenta à la période E14.5 (Bonnin et al. 2011). Cette manipulation pharmacologique a réduit de façon significative les niveaux de 5-HT dans le placenta et dans le *forebrain* fœtal, mais non dans le *hindbrain* du fœtus. Ces études *in vivo* et *ex vivo* ont montré qu'une source exogène de 5-HT produite dans le placenta est nécessaire pour maintenir des niveaux de 5-HT dans le *forebrain* durant les phases initiales du développement fœtal (figure 4) et que les altérations dans l'environnement maternel peuvent se répercuter dans la manutention du système sérotoninergique fœtal, et avoir ainsi un profond impact sur le fonctionnement normal de cet organe. Des études ont porté leur attention sur les perturbations qui peuvent se produire dans le système sérotoninergique durant les périodes précoces du développement avec des répercussions à long terme. Parmi les types de perturbations, se détache la dénutrition maternelle.

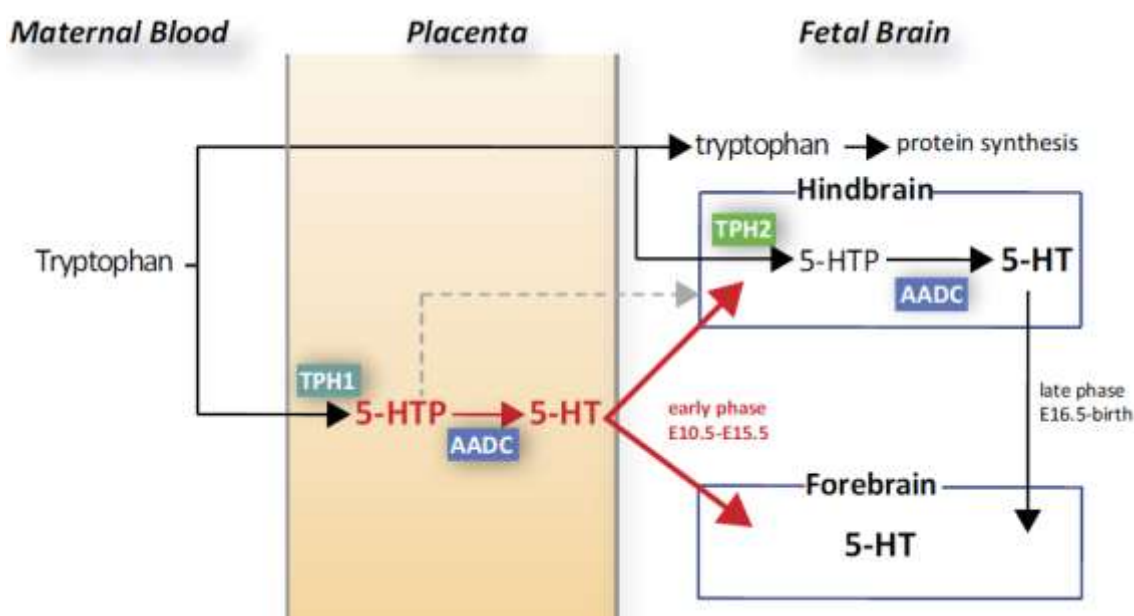


Figure 4. Nouveau modèle de contribution de sérotonine pour le cerveau fœtal. Le placenta synthétise 5-HT et 5-HTP à partir du Trp maternel et sert de source de 5-HT pour le *forebrain* durant la phase initiale de développement (E10 à E15) (Bonnin and Levitt, 2011).

2.2.6 Système sérotoninergique et dénutrition maternelle

Des individus ou des animaux expérimentaux qui ont souffert de dénutrition dans l'utérus ou durant les premiers temps post-natals ont présenté des déficits d'apprentissage et de mémoire, une plus grande susceptibilité au stress, et ont réduit les réponses du système nerveux central aux drogues psychoactives (Almeida, Tonkiss et al. 1996; Morgane, Mokler et al. 2002). En plus de ces anomalies de comportement, la déficience précoce des nutriments produit des altérations dans divers systèmes de neurotransmetteurs (Wiggins, Fuller et al. 1984; Almeida, Tonkiss et al. 1996). La 5-HT est un neurotransmetteur amplement étudié qui joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement de l'organisme au long de la vie. L'apparition précoce du système sérotoninergique durant l'embryogenèse suggère l'hypothèse que la 5-HT joue un rôle régulateur dans le neurodéveloppement. Certaines études ont abordé l'impact à court terme et à long terme de la dénutrition durant les périodes précoces de la vie sur le système sérotoninergique.

En 1975, Stern et al. ont établi que des rats soumis à la dénutrition protéique durant le développement ont présenté une concentration élevée de 5-HT dans des régions du cerveau et dans des tissus périphériques à la naissance et au 11^{ème} et 30^{ème} jours de vie, ce qui suggère que la dénutrition affecte le métabolisme de la 5-HT et que le cerveau n'est pas épargné à partir de changements neurochimiques observés dans des organes périphériques (Stern, Morgane et al. 1975). En accord avec ces résultats, Resnick et Morgane (1984) ont montré que des rats dont les mères avaient été exposées à une diète pauvre en protéines (caséine 6%) durant la période de la gestation ont présenté une augmentation dans les concentrations de 5-HT cérébrale, de même que de leur aminoacide précurseur, le TrP (Resnick and Morgane, 1984).

Des réponses à long terme ont été établies sur des animaux à 22 jours de vie, dont les mères avaient été exposées à une diète pauvre en protéines (caséine 6%) durant les périodes de gestation et de lactation. Ils ont présenté une augmentation dans la libération de 5-HT dans les tissus de l'hippocampe (Chen, Tonkiss et al. 1992; Chen, Yoshida et al. 1995) et une augmentation dans la réponse de la libération de 5-HT après stimulation électrique du noyau moyen de la raphe (Mokler, Bronzino et al. 1999). En contraste avec ces études sur les niveaux de 5-HT et leur libération dans le cerveau, des études ont montré une diminution accentuée de l'inervation sérotoninergique dans l'hippocampe des animaux dénutris (Blatt et

al. 1994). Une explication possible pour une augmentation de la libération basale de 5-HT peut être un événement compensatoire de la réduction de leur innervation engageant une diminution dans la régulation de leurs autorécepteurs aussi bien dans le noyau raphe que dans l'hippocampe.

Manjarrez-Gutiérrez et al. (2012) ont proposé que l'élévation chronique des niveaux de 5-HT observée dans le cerveau des petits soumis à la dénutrition périnatale est probablement due à une altération dans l'activité de l'enzyme TPH1, enzyme responsable pour la synthèse de 5-HT (Manjarrez-Gutierrez, Martinez-Radilla et al. 2012). Ces résultats sont intéressants parce qu'il a été rapporté et accepté que la TPH1 apparaît de préférence dans le rat adulte en différents organes périphériques (glande pinéale, intestin, cœur, thymus, rate, poumons, etc.) en comparaison avec TPH2 que l'on croyait initialement exprimé dans les neurones sérotoninergiques localisés dans le cerveau. Cependant l'apparition de TPH1 a été observée à la naissance, ce qui suggère fortement son activité dans le cerveau dans la période prénatale (Manjarrez-Gutierrez, Martinez-Radilla et al. 2012).

A partir de ces études, on s'est intéressé à mettre en relation certaines modifications comportementales d'animaux dénutris avec l'altération du système sérotoninergique, puisque ce neurotransmetteur se trouve engagé dans diverses fonctions physiologiques. Il a été établi que l'administration de l'anxiolytique, chlorodiazépoxide benzo diazépine, à des animaux dénutris, réduit la libération de 5-HT dans l'hippocampe (Mokler, Galler et al. 2003). Les benzo diazépines sont connus pour réduire les niveaux extracellulaires de 5-HT chez des rats stressés, ce qui suggère que la réduction de la libération de 5-HT dans l'hippocampe chez des rats exposés à la dénutrition protéique pré-natale peut être associée à une augmentation de la réponse de l'animal au stress (Mokler, Galler et al. 2003). En parallèle, des rats dénutris durant la gestation présentent une augmentation des niveaux de 5-HT et de 5-HIAA quand ces animaux sont exposés à la séparation maternelle après la naissance, ce qui constitue un modèle de stress assez utilisé dans les recherches expérimentales (Kehoe et al. 2001).

Des études ont eu comme objectif de chercher les effets de la fluoxétine (inhibiteur de la réception de la sérotonine) sur l'agressivité de rats adultes exposés à la dénutrition durant la période de lactation. On a montré que la fluoxétine réduit l'agressivité chez les animaux contrôles, fait que l'on n'observe pas chez les animaux dénutris, ce qui suggère que le système sérotoninergique est affecté par la dénutrition durant les périodes critiques du

développement (Barreto-Medeiros, Feitoza et al. 2004). La fluoxétine a aussi été utilisée pour évaluer le comportement du système immunitaire des animaux exposés à la dénutrition durant la période de lactation. On a montré que la libération d'oxyde nitrique dans la présence de fluoxétine est réduite dans les macrophages alvéolaires d'animaux dénutris durant la période de développement (Ferreira, Galvao et al. 2009). On a également établi que des rats dénutris durant la période de gestation présentaient une altération dans le cycle sommeil-veille et ce fait a été associé aux altérations trouvées dans les niveaux de 5-HT cérébral. Les altérations du sommeil peuvent avoir un impact sur le comportement social et dans les fonctions cognitives de ces animaux (Datta and Hobson, 2000).

A grandi l'intérêt des recherches sur les influences de la dénutrition durant la période de développement fœtal sur les récepteurs de 5-HT. On a observé chez des animaux adultes dénutris durant la gestation une augmentation dans la densité de récepteurs 5-HT_{1A}, accompagnés d'une élévation des niveaux de 5-HT dans le tonc cérébral et dans le cortex cérébral, ce qui suggère que le mécanisme de régulation de l'expression des récepteurs de 5-HT au moment de la naissance ne paraît pas dépendre de l'augmentation de la quantité de neurotransmetteurs au niveau synaptique, parce que, dans ce cas, on pourrait attendre que les animaux dénutris aient une densité plus faible de ces récepteurs comparée à la faible régulation observée dans le cerveau adulte (Manjarrez et al. 2003).

Les niveaux d'expression génique du récepteur 5-HT_{1A} chez des animaux dénutris ont fait l'objet de recherches. Manuel-Apolinar et al. (2014) ont montré que la dénutrition calorique augmente l'expression de ce récepteur dans l'hypothalamus des animaux et ils ont associé cette découverte avec l'hyperphagie présentée dans la période post-natale et dans la vie adulte (Manuel-Apolinar et al. 2014). Lopes de Souza et al (2008) ont établi que la restriction de protéines durant le développement périnatal atténue l'action inhibitrice de la 5-HT sur la consommation des aliments à travers la réduction de la sensibilité des récepteurs 5-HT_{1B} (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008). Ces résultats confirment l'idée que les altérations adaptatives de la signalisation de 5-HT se développent pour compenser les niveaux élevés de 5-HT dans le cerveau induits par la dénutrition précoce. Dans le contexte de l'hypothèse de la programmation fœtale de l'obésité, ces observations indiquent que l'hyperphagie induite dans l'utérus et la restriction de nutriments néonataux sont liées à la réduction de la fonction anorexique de la 5-HT sur l'ingestion des aliments.

Ces travaux montrent à l'évidence l'impact étendu de la dénutrition maternelle sur le système sérotoninergique. Si l'on considère que la 5-HT est un des métabolites du Trp, il est d'un grand intérêt de chercher quelles sont les répercussions de la dénutrition maternelle sur le métabolisme de cet acide aminé, qui ne se restreint pas seulement à la voie métabolique de la 5-HT.

2.3 Métabolisme du tryptophane

Les acides aminés sont non seulement régulateurs de l'expression génique et des cascades de phosphorylation protéique, mais ils sont aussi des molécules de signalisation cellulaire. La formule squelettique des acides aminés essentiels ne peut être synthétisée par les cellules des animaux, et de cette façon elle doit être acquise uniquement à travers la diète (Wu, 2000). Le Trp est un des acides aminés essentiels connus. On le trouve dans tout le spectre phylogénétique depuis les plantes jusqu'aux mammifères supérieurs, il est considéré évolutivement comme un ancien composé chimique. Sa structure est montrée sur la figure 5. Le Trp est capable d'absorber la lumière, et il est de vitale importance pour la production d'énergie durant la photosynthèse. Cette caractéristique est attribuée à la présence d'un *indole ring* dans sa structure. Le Trp peut être converti en auxine, un facteur trophique, guidant la croissance et la différenciation cellulaire dans les plantes (Azmitia, 2001).

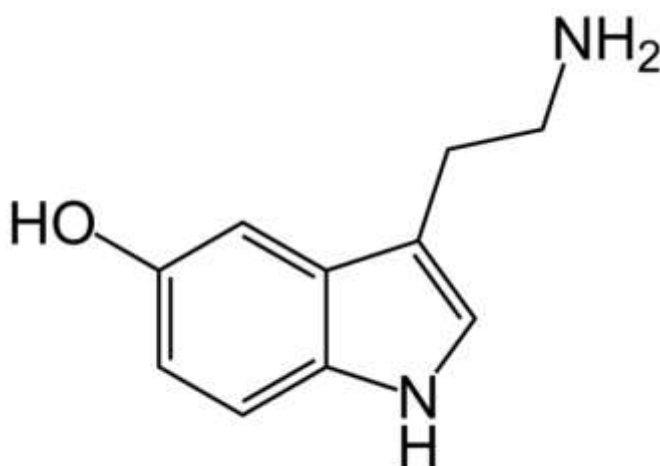


Figure 5. Structure chimique du tryptophane.

Chez les mammifères, à l'inverse des autres acides aminés, le Trp circule dans le sang et dans le plasma lié principalement à l'albumine (Pardridge, 1979). Seulement 10-20% de Trp

est présent sous forme libre dans le plasma. Une des fonctions physiologiques importantes du Trp dans le corps est son utilisation dans la synthèse protéique, mais la quantité moyenne de protéine totale synthétisée dans le corps à partir du Trp est d'environ 1,2 gr pour 100 gr de protéine totale, valeur faible comparée aux autres aminoacides indispensables, tels que la lysine qui représente 7,6 gr, la leucine (7,1 gr) et la tréonine (4,0 gr) (Mahan and Shields 1998). L'être humain adulte synthétise et dégrade 300 gr de protéine par jour, c'est donc près de 3-3,6 gr de Trp qui sont incorporés et libérés des protéines chaque jour (Garlick, Clugston et al. 1980). Outre qu'il est une partie structurelle des protéines, le Trp est le précurseur d'importants composants physiologiques, comme la 5-HT et la KYN. Un des facteurs qui influencent la disponibilité de Trp comme substrat des deux composants cités plus haut est le niveau de Trp libre dans le plasma.

La synthèse de 5-HT est proportionnelle au transport de Trp à l'intérieur du cerveau (Pardridge, 1998). Le Trp est transporté à l'intérieur du cerveau par un transporteur localisé dans les capillaires de la barrière hématoencéphalique. Ce transporteur est partagé avec les aminoacides neutres comme la leucine, la valine, l'isoleucine, et les trois aminoacides de la chaîne ramifiée (BCAA), la tyrosine, la phénylalanine et la méthionine. En conséquence, l'entrée du Trp dans le cerveau est influencée par la relation entre le Trp et les aminoacides qui partagent le même transporteur, particulièrement le BCAA, qui sont présents dans une plus grande proportion que le Trp dans le plasma (Pardridge, 1998). Le Trp lié à l'albumine semble aussi influencer son transport pour l'intérieur du cerveau (Pardridge, 1993). Resnick et Morgane ont suggéré que ce résultat puisse être lié à la diminution dans la proportion de Trp libre ou lié à l'albumine dans le plasma d'animaux dénutris. L'on sait que les rats dénutris présentent de plus faibles niveaux d'albumine, en comparaison avec les animaux contrôles (Resnick and Morgane 1984). Ainsi se produit une élévation de la fraction libre de Trp plasmatique après la naissance, suggérant une augmentation du transport de cet aminoacide pour le cerveau, avec une augmentation possible de la synthèse de 5-HT durant la période critique de différenciation cérébrale (Resnick and Morgane 1984).

De cette façon, l'augmentation des niveaux de 5-HT est directement liée au transport de cet aminoacide au niveau cérébral, fait qui peut dépendre de l'augmentation des concentrations de Trp dans la diète ou dans le plasma (Henry, Seve et al. 1992; Henry 1996; Sarwar and Botting 1999). Au contraire, la déficience de Trp empêche la synthèse de 5-HT dans le cerveau (Henry, 1996). Des études expérimentales ont observé que la chute des

niveaux de 5-HT dans le cerveau peut être due à une ingestion d'une diète riche en aminoacides, mais libre de Trp, lequel entraîne une augmentation de la synthèse protéique, mais en même temps une réduction dans la synthèse de 5-HT cérébral (Nishizawa, Benkelfat et al. 1997; Lieben, Blokland et al. 2004). Comme on l'a dit, le système sérotoninergique joue un rôle important dans la régulation de divers processus physiologiques et comportementaux, tels que l'humeur, la cognition, l'activité physique, le sommeil et l'appétit. Une fonction sérotoninergique dans le cerveau altérée par la disponibilité inadéquate de Trp est par conséquent reconnue comme un facteur qui contribue à des difficultés affectives : anxiété, agressivité, stress, désordres alimentaires et autres.

Des études cliniques établissent à l'évidence que des niveaux altérés de Trp peuvent affecter l'état de l'humeur. Les effets bénéfiques de l'augmentation des niveaux de Trp sont observés chez des patients souffrant de dépression légère ou modérée (Young and Leyton, 2002). Des études contrôlées avec placebo ont montré la capacité du Trp de multiplier l'action antidépressive des inhibiteurs de la MAO et d'avoir des effets équivalents à ceux de l'amitryptiline, produit qui augmente les concentrations plasmatiques de 5-HT (Thomson et al. 1982). Toutefois chez des individus sains, la littérature indique que l'augmentation de la concentration de Trp a des effets minimes ou nuls sur l'humeur (Silber and Schmitt, 2010). En outre, la déficience en Trp induit des altérations dans l'anxiété et la dépression chez les rats (Blokland, Lieben et al. 2002). De forme semblable, la réduction des niveaux de Trp augmente l'anxiété et l'irritabilité chez les êtres humains qui souffrent de troubles psychiatriques (Russo, Kema et al. 2003). Différentes études sur des animaux ont montré également que l'augmentation des niveaux de Trp peut atténuer l'agressivité (Gibbons, Barr et al. 1979; Shea, Mench et al. 1990). En tests de laboratoire, une réduction de l'agressivité a été trouvée dans des groupes qui avaient reçu des doses supérieures de Trp comparées aux groupes qui avaient reçu une quantité plus faible de cet aminoacide (Pihl, Young et al. 1995; Bjork et al., 2000).

L'amélioration des aspects cognitifs, comme de la mémoire à long terme, a été démontrée chez des individus après l'addition de Trp (Silber and Schmitt, 2010). D'un autre côté, la déplétion aiguë de cet aminoacide nuit à la mémoire épisodique comme à la reconnaissance en test d'apprentissage auditivo-verbal (Mendelsohn, Riedel et al. 2009). Les différentes réponses aux niveaux de Trp plasmatique ont été également rapportées entre les sexes. On a montré que les femelles ont un plus grand ensemble de stimulus émotionnels

après adjonction de Trp (Silber and Schmitt, 2010) et une plus grande vulnérabilité aux effets de la déplétion aiguë de Trp sur la mémoire épisodique (Sambeth, Blokland et al. 2007). Le métabolisme du Trp est également engagé dans le contrôle de l'axe hypothalamique-pituitaire-supra-rénal (HPA) (Markus, Firk et al. 2008). On a montré que les augmentations des niveaux de Trp plasmatique améliorent l'humeur et réduisent la réponse du cortisol après l'exposition au stress chez les individus sains comme chez les individus malades (Markus, Olivier et al. 2000; Firk and Markus, 2009). Les études sur les animaux révèlent également que chez les porcs l'adjonction de Trp (3-4 fois plus forte que ce qui est recommandé) peut entraîner la réduction basale dans les concentrations de cortisol plasmatique, diminuant ainsi la réponse au stress de l'axe HPA (Koopmans, Ruis et al. 2005; Guzik, Matthews et al. 2006; Koopmans, Guzik et al. 2006).

Le Trp est également le précurseur d'un autre métabolite stable appelé KYN. Deux enzymes sont capables de catalyser la conversion du Trp en KYN : le tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) et l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). Ces deux enzymes diffèrent par leur localisation dans le tissu (figure 6), par leur structure chimique, par la spécificité du substrat, par leur fonction, et ont différentes affinités avec les isoformes variées de Trp (Rafice, Chauhan et al. 2009). La TDO peut être induite par la liaison de corticostéroïdes dans ses récepteurs ou par des cytokines pro-inflammatoires, et se trouve localisée principalement dans le foie. La IDO est diffusée dans de nombreux tissus, y compris dans le cerveau, du fait que cette enzyme est exprimée en astrocytes, macrophages, dans la microglie et dans les cellules dendritiques (Ruddick, Evans et al. 2006). La IDO est induite directement par des cytokines pro-inflammatoires qui sont libérées durant la réponse immunitaire. L'interféron- γ est un des principaux médiateurs de sa transcription et son activation augmente la relation KYN/Trp. Bien que le Trp traverse facilement la barrière hémato-encéphalique, les niveaux d'IDO sont plus faibles dans le cerveau comparés avec la périphérie, ainsi près de 60% du métabolisme de la KYN cérébrale sont initiés par la pénétration directe de ce métabolite dans le cerveau après avoir été synthétisée dans la périphérie et absorbée par les astrocytes et par les cellules microglies, en utilisant un transporteur de l'acide aminé neutre (Fukui, Schwarcz et al. 1991).

Des altérations dans la disponibilité de Trp peuvent se répercuter dans le métabolisme de la KYN. L'IDO est activée durant la gestation, agissant sur l'immunotolérance fœtale (Moffett and Namboodiri, 2003; Schrocksnadel, Widner et al. 2003). On a établi que la

réduction de l'activité de l'IDO dans le placenta et les niveaux élevés de Trp dans le placenta se rencontrent dans des états de pré-éclampsie (Kudo, Boyd et al. 2003). La restriction de la quantité de Trp dans la diète réduit la synthèse de KYN et se répercute sur la pathogenèse de la cataracte chez les rats (Raju, Kanth et al. 2007). L'addition de Trp dans la diète aide à préserver l'homéostasie de cet aminoacide chez les porcs qui souffrent d'inflammation pulmonaire (Le Floc'h N et al. 2008). En outre la déficience en Trp provoque la démence et peut affecter l'état immunologique contrôlé par l'enzyme IDO (Penberthy, W.T.). Dans l'étude d'Okuno et al. (2011), le renforcement de la diète avec la Trp altère le métabolisme de la KYN de façon à augmenter les niveaux d'acide kynurénique (KA), métabolique de la KYN qui est directement lié à des altérations cognitives (Okuno, Fukuwatari et al. 2011).

Durant des dizaines d'années l'intérêt pour les produits du métabolisme du Trp s'est trouvé centré sur les fonctions physiologiques de la 5-HT. L'on sait pourtant que 90% du TRP dégradé sont convertis en KYN et moins de 5% du Trp ingéré seraient utilisés pour la synthèse de la 5-HT (Wolf and Hoffmann, 1974; Stone and Darlington, 2002). La KYN a été identifiée dans les premières années du XXème siècle comme source catabolique de la vitamine B3 (acide nicotinique ou niacin). Elle a été considérée seulement comme une voie pour la production endogène de cette vitamine, avec l'objectif de compenser quelque déficience diététique. Elle est aujourd'hui reconnue pour développer d'importantes fonctions tant au niveau périphérique que sur le système nerveux central.

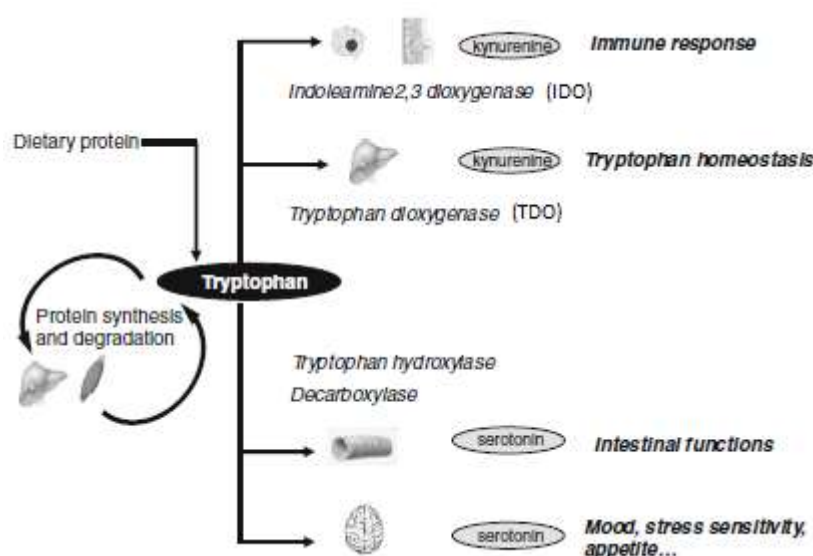


Figure 6. Schéma des diverses fonctions du tryptophane en différents tissus.

2.3.1 Métabolisme de la kynurénine

La voie métabolique de la KYN est complexe. Elle est engagée par le clivage oxydatif du Trp par l'enzyme IDO ou TDO pour produire N-formilkynurénine, et la synthèse ultérieure KYN. Le méabolisme suivant de la KYN suit trois mécanismes : 1) Déamination par la kynurénine amino-transfèrase (KAT), pour produire KA. 2) Dégradation par la kynuréninase (KYNU) résultat de la production d'acide antranilique (AA). 3) Hydroxylation par la KMO pour la production de 3-hydroxykynurénine (3-HK). 3-HK est métabolisé par la KAT en acide xanthorénique (XA) ou converti en acide 3-hydroxy-antranilique (3-HANA) par l'enzyme KYNU, ensuite, oxydé par 3-hydroxyantranilate 3,4 dioxygénase (3-HAO) en acide 2-amino-3-carboxymuconique 6-semialdéide (ACMS). Sous des conditions physiologiques, cet intermédiaire se regroupe spontanément pour former l'acide kynolinique (QA), lequel est ensuite transaminé par la phosphorribosyltransfèrase kynolinate (QPRT) pour produire l'acide nicotinique, et finalement le dinucléotide de nicotinamide et l'adénine (NAD^+) (Maddison and Giorgine, 2015). (figure 7).

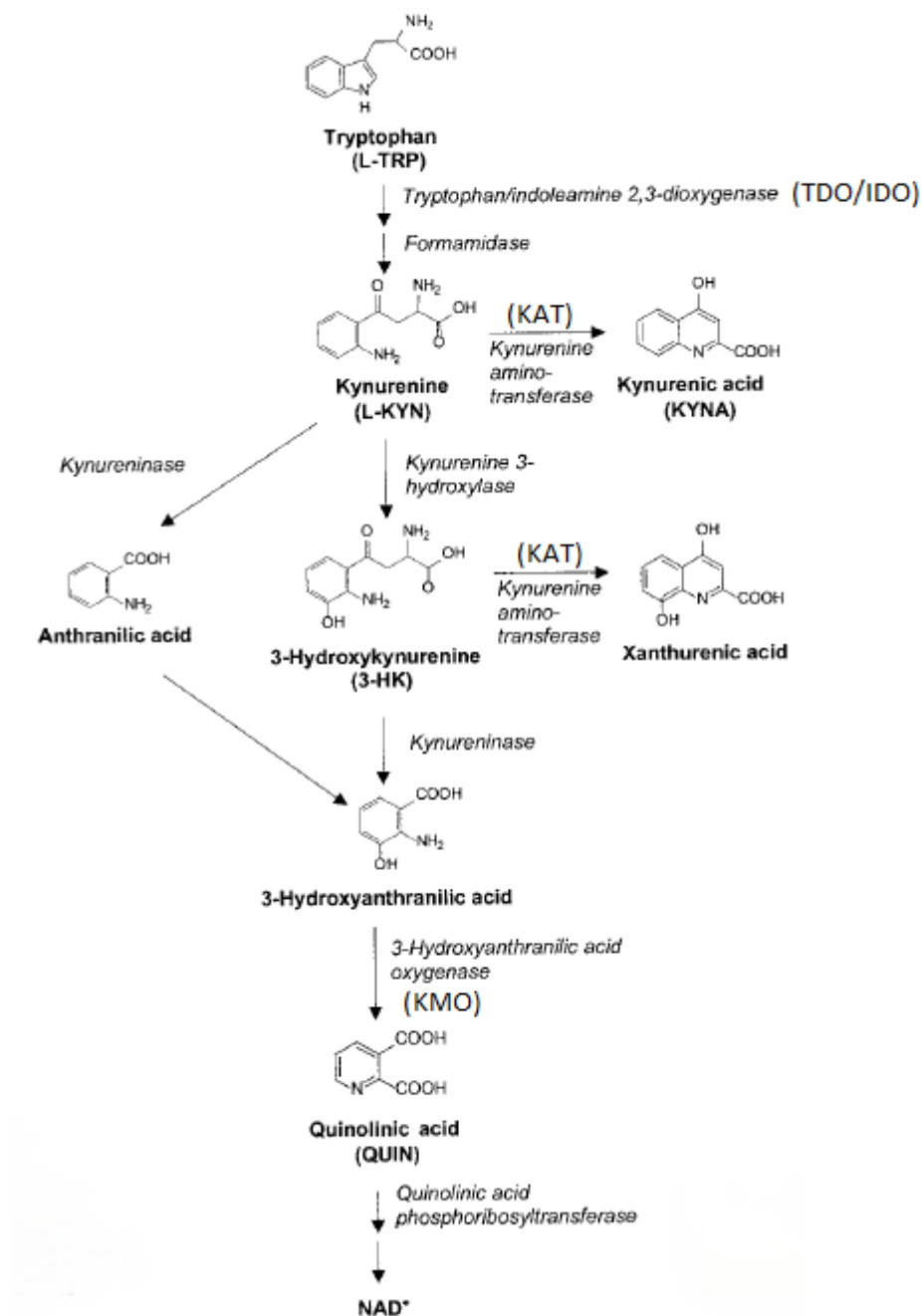


Figure 7. Synthèse de la voie métabolique de la kynurénine.

Le rôle physiologique de la voie KYN a été initialement attribué à la formation de la co-enzyme NAD^+ , qui est engagée en divers processus biologiques, tels que des réactions d'oxydoréduction essentielles pour la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique (Ying W, 2008). Des études suivantes ont montré que les métabolites intermédiaires produits par la voie de la KYN, connus comme kynurénines, jouaient un rôle important dans certaines

fonctions physiologiques telles que le comportement, le sommeil, la thermorégulation et la gestation (Curzon 1996, Stone et al. 1993). La voie métabolique de la kynurénine est aussi assez liée à la réponse inflammatoire. Ses intermédiaires, le KA et le QA, sont capables d'induire l'expression de plusieurs cytokines, chimiokines et de leurs récepteurs en astrocytes, provoquant l'inflammation (Guillemin, Smith et al. 2000). En outre, ces dernières années, ces composés ont été mis en relation avec la physiologie de plusieurs maladies métaboliques et perturbations cognitives.

2.3.2 Métabolites de la kynurénine et leur rôle sur le métabolisme

L'obésité, le diabète de type 2, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle et la maladie coronarienne sont décrits dans la littérature comme les principales pathologies qui caractérisent le syndrome métabolique. L'inflammation chronique est actuellement considérée comme une manifestation clinique commune de ce syndrome. Un des mécanismes par lesquels l'inflammation chronique peut déclencher ou maintenir le développement du syndrome métabolique est l'induction de la transcription d'IDO par des cytokines inflammatoires. L'obésité humaine par exemple est caractérisée par un faible degré d'inflammation chronique du tissu adipeux blanc qui libère de nombreux médiateurs inflammatoires, y compris KYN (Watts SW et al. 2011, Scarpellini and Tack, 2012). Des niveaux plasmatiques de KYN et l'expression d'IDO dans les tissus adipeux et dans le foie ont été plus élevés chez des femmes obèses que chez des femmes maigres (Wolowczuk, Hennart et al. 2012). KYN et les marqueurs inflammatoires, y compris la protéine C-réactive, se trouvent à des niveaux élevés chez les individus obèses morbides (Brandacher, Hoeller et al. 2007). La déficience de P5P (une forme active de la vitamine B6) a été observée chez 11% des individus obèses morbides avant la gastrectomie verticale laparoscopique (Damms-Machado, Friedrich et al. 2012). De même, de faibles concentrations de P5P ont été enregistrées chez des femmes et des hommes avec obésité morbide en Norvège (Aasheim and Bohmer, 2008). On a également observé que les niveaux de Trp libre dans le plasma se trouvent réduits chez les rats obèses indépendamment de la perte de poids ou de la diète alimentaire (Finkelstein, Chance et al. 1982; Brandacher, Hoeller et al. 2007). La proportion Trp/KYN est significativement augmentée chez les patients obèses en comparaison avec le groupe contrôle et ne se normalise pas après réduction de poids. En outre, ces altérations dans le métabolisme du Trp peuvent, par la suite, réduire la production de 5-HT et causer des

perturbations de l'humeur, la dépression et le retard de la satiété, conduisant à l'augmentation de l'absorption calorique et à l'obésité (Brandacher, Winkler et al. 2006).

En relation aux maladies coronariennes, l'inflammation et l'activation du système immunologique jouent également des rôles importants. On a observé la réduction de la concentration de Trp et l'augmentation de la relation Trp/KYN dans une proportion significative chez des patients ayant des maladies cardiaques coronariennes (Wirleitner, Rudzite et al. 2003). Des recherches sur 986 jeunes et 921 personnes âgées, ont mis en relation l'activité de l'IDO avec divers facteurs de risques pour le développement de l'artériosclérose (Pertovaara, Raitala et al. 2007; Niinisalo, Raitala et al. 2008). La réactivité oxydative de 3-HK et 3-HANA, deux autres métaboliques de la KYN, peuvent contribuer à compromettre la fonction mitochondriale au niveau cardiaque assumant un rôle important sur les processus cardiovasculaires (Baran et al. 2003).

Le XA a été le premier métabolite de la voie de la KYN à être observé à des niveaux élevés dans les échantillons d'urine de patients ayant le diabète de type 2 en comparaison avec des individus sains (Hattori and Kotake, 1984). Une étude récente a montré l'augmentation des niveaux de substances précurseurs du XA, comme la KYN et le 3-HK, dans des échantillons de sérum de patients diabétiques (Munipally et al. 2011). En outre, l'administration de XA induit expérimentalement le diabète chez les rats (Kotaki Y, et al. 1975). Les mécanismes possibles qui permettent la contribution de XA pour le développement du diabète sont : 1) La formation de complexes de chélate avec insuline (XA-In) que l'on ne peut distinguer de l'insuline, car ils ont 49% moins d'activité que l'insuline pure (Kotaki Y, et al. 1975). 2) La formation de Zn ++ dans les cellules beta qui exercent un effet toxique dans les îlots pancréatiques isolés (Meyramov, Korchin et al. 1998). 3) L'inhibition de la libération de l'insuline du pancréas des rats (Rogers and Evangelista, 1985). 4) L'induction de l'apoptose pathologique au moyen de caspase-3 des cellules beta pancréatiques (Malina 2001; Wang, Crager et al. 2012).

Le KA représente aussi un important métabolite dans le développement du diabète *mellitus* de type 2. Une étude récente a constaté des niveaux élevés de KA dans l'urine de primates non humains et de rats avec diabète *mellitus* de type 2 (Patterson, Bonzo et al. 2011) et chez des patients avec rétinopathie diabétique (Munipally et al. 2011). Les mécanismes possibles de l'effet diabétogénique du Ka peuvent être liés à la capacité de ce métabolite de bloquer les récepteurs de NMDA. L'acide 7-chlorokynurénique (antagoniste de NMDA et précurseur pharmacologique du KA) et le MK-801 (antagoniste de NMDA) augmentent la

production de glucose chez les rongeurs (Lam, Chari et al. 2010; Schwarcz, Bruno et al. 2012). En outre, XA, KA, et leurs dérivés, QA et 8-HQ, inhibent la synthèse de l'insuline dans les îlots pancréatiques isolés chez les rats (Noto and Okamoto, 1978). Une étude récente a révélé une expression élevée d'IDO dans des échantillons de sérum de patients avec rétinopathie diabétique (Munipally, Agraham et al. 2011). Dans la même ligne, l'addition de Trp à la diète, substrat pour la formation de KA et XA, induit la résistance à l'insuline chez les porcs (Koopmans, Ruis et al. 2009).

On peut suggérer que le système nerveux central soit engagé dans le développement et la manutention de l'hypertension artérielle chez les rats en raison du tonus sympathique élevé (Nagatsu, Nagatsu et al. 1971; Judy, Watanabe et al. 1976). Récemment, Ito et al. ont montré que l'injection de KA dans la moelle ventrolatérale de rats hypertendus réduit la pression artérielle à 40 mmHg (Ito, Sato et al. 2000). Sur la base de cette observation on a émis l'hypothèse qu'il existe une augmentation relative des niveaux de KA dans les neurones vasomoteurs localisés dans la moelle ventrolatérale de rats hypertendus. En outre, l'enzyme KYNU semble contribuer aussi à l'hyper-tension des rats. Une étude a montré que des rats hypertendus présentaient une augmentation de l'expression génique de la KYNU, laquelle joue un rôle important dans la réduction des niveaux de KYN plasmatique (Mizutani, Sugimoto et al. 2002). On a également observé que l'administration de l'antagoniste de KA dans l'espace subarachnoïde de la moelle avait de profonds effets hypertenseurs sur la pression artérielle de base chez des rats hypertendus (Ito and Sved, 1997).

Outre le rôle important de KYN et de ses composés intermédiaires sur le métabolisme, lequel se répercute directement sur le développement du syndrome métabolique, est également de fondamentale importance la compréhension de la fonction de la voie métabolique de la KYN sur les perturbations cognitives typiquement présentes dans les neuropathologies.

2.3.3 Métabolites de la kynurénine et leur rôle sur la cognition

La complexité neurale de la fonction cognitive rend extrêmement difficile d'identifier les substrats neurochimiques spécifiques, spécialement ceux qui peuvent fournir des cibles pharmacologiquement pertinentes pour la prévention ou le traitement des perturbations de la cognition (Millan, Agid et al. 2012). La plus grande partie des neurotransmetteurs reconnus

dans le SNC sont liés à certains aspects de la cognition, qu'il s'agisse de facteurs primaires ou de systèmes dont l'activité est modifiée comme une conséquence secondaire d'un événement antérieur. Parmi les candidats à un rôle premier dans la cognition se trouvent la noradrénaline, la dopamine et le 5-HT (Sarter, Bruno et al. 2007; Robert and Benoit, 2008; Tadaiesky, Dombrowski et al. 2008). Bien d'autres systèmes de neurotransmetteurs, comme ceux de l'histamine et la libération de neuropeptides, ont été impliqués dans le rôle cognitif ou sa modification par des drogues (Minzenberg and Carter, 2008).

Les deux systèmes qui ont actuellement reçu la plus grande attention sont ceux qui libèrent le glutamate ou l'acétylcholine dans les terminaux synaptiques. Ces deux systèmes ont un rôle bien établi dans divers aspects de la fonction cognitive, avec un centre d'intérêt sur les récepteurs de glutamate NMDA (Newcomer, Swan et al. 2001; Neill, Barnes et al. 2010). L'importance de ces deux systèmes est confirmée par la capacité des agonistes et des antagonistes d'affecter le comportement cognitif et pour certains de ces composés d'agir comme puissants agents thérapeutiques. De grands progrès ont été faits dans le domaine touchant la composition des sous-unités des récepteurs d'importance comportementale. Par exemple, des rats qui ont une augmentation de l'expression des sous-unités GluN2B montrent une amélioration de la cognition et de la plasticité (Cui et al. 2011). Bien que la connaissance détaillée au niveau moléculaire de ces récepteurs soit importante, la compréhension des mécanismes qui conduisent l'activation ou la modulation de tels récepteurs, y compris ceux qui impliquent la voie de la KYN, ne peuvent être oubliés.

En accord avec diverses conditions pathologiques, une dégradation accélérée de Trp avec une augmentation concomitante des niveaux de KYN, comme de ses intermédiaires, est très souvent observée en sérum, dans le liquide céphalorachidien (LCR) et dans le tissu cérébral de patients avec diverses maladies qui engagent le système nerveux central et qui entraînent une perturbation cognitive importante. Les pathologies associées à l'augmentation de la régulation de la voie de KYN incluent des maladies infectieuses (HIV), des maladies neurologiques (Alzheimer, Huntington, et sclérose latérale amyotrophique), des perturbations affectives (schizophrénie, dépression et anxiété) et des maladies auto-immunes (sclérose multiple et arthrite rhumatoïde). Toutes ces pathologies se caractérisent par la présentation, au cours de leur développement, de perturbations dans les processus cognitifs, tels que des altérations de la perception, de la mémoire, du raisonnement, de la pensée et du langage

(Guillemin G, Brew BJ, 2002; Guillemin GJ, 2005; Bruijn Li et al. 2004, Beal, Matson et al. 1990; Zamanakou, Germenis et al. 2007).

Avec la grande avancée de la science il a été possible d'effectuer des recherches sur le rôle important de deux principaux métaboliques intermédiaires dans la voie de la KYN en diverses situations pathologiques telles que décrites ci-dessus. Il s'agit du QA et du KA. Ceci a eu lieu parce que ces composés ont été liés à des conditions neurobiologiques quand leurs effets stimulants ou convulsivants et sédatifs ou anti-convulsivants ont été décrits (Lapin IP, 1978, Carpenedo R et al. 1994), et parce qu'ils agissent sur les récepteurs NMDA et les récepteurs $\alpha 7$ nAChRs, qui sont liés à des fonctions cognitives (Gould and Higgins, 2003, Bast et al. 2003).

A l'origine le QA a été découvert parce qu'il excite les neurones du cortex cérébral de rats anesthésiés, un effet inhibé par des antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA (Stone and Perkins, 1981). Ces récepteurs continuent d'être le lieu le plus important de l'action du QA, car ils sont responsables de son activité excitatoire et de sa capacité de produire de l'excitotoxicité (Schwarcz, Whetsell et al. 1983). Le QA peut gérer ou promouvoir la formation d'espèces réactives d'oxygène, et a un profil généralement pro-inflammatoire dans le système immunitaire, augmentant l'expression et la sécrétion de molécules chimiotactiques, telle que la protéine chimiotactique de monocytes 1 (MCP-1). Sous conditions inflammatoires, les macrophages, la microglie et les cellules dendritiques sont les principales sources de production de QA (Moffett, Espey et al. 1993; Heyes, Achim et al. 1996). Les astrocytes, en contraste, sont incapables de synthétiser le QA, en raison de l'absence de l'enzyme kynurénine hydroxylase (Guillemin, Smith et al. 2000). Au lieu de cela, neurones et astrocytes, qui sont des neuroprotecteurs, captent le QA et l'utilisent pour cataboliser NAD (Guillemin, Cullen et al. 2007). Cependant ce système catabolique étant facilement saturé, la présence de quantités élevées de QA produites sous des conditions pathologiques, aboutit alors à l'accumulation toxique de ce métabolite à l'intérieur des cellules (Guillemin, Smythe et al. 2005).

En outre, le QA peut réguler l'activation des cellules T, stimuler la peroxydation des lipides et agir sur la dysfonction mitochondriale (Rios and Santamaria 1991; Behan and Haberly, 1999; Guillemin, Williams et al. 2003). Comme elle est une molécule endogène dans le système nerveux central des mammifères, les propriétés immunitaires et neurotoxiques du QA sont spécialement intéressantes (Wolfensberger, Amsler et al. 1983). Des études réalisées sur

des cultures de rats indiquent que les concentrations de QA, dans le système cortico-strial, plus importantes que les concentrations physiologiques, peuvent causer une neurodégénération après quelques semaines d'exposition (Whetsell and Schwarcz, 1989). On a observé que les neurones sont hautement sensibles aux variations des niveaux de QA causant la mort des cellules exposées à des concentrations nanomolaires de ce métabolite (Pedra, Brandt et al. 2003). *In vitro*, la synthèse de QA par les cellules CD8⁺ a induit l'apoptose dans les cellules (Belladonna, Grohmann et al. 2006). QA peut aussi inhiber sélectivement la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et de cellules *natural killer* activées (Frumento, Rotondo et al. 2002). Diverses études ont déjà fourni de fortes évidences qui suggèrent que le QA joue un rôle pathologique significatif dans le développement de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Huntington, la maladie d'Alzheimer et dans le complexe de démences du SIDA (Beal, Matson et al. 1990; Guillemin, Kerr et al. 2005).

Des études ont souligné l'effet neurotoxique possible du QA, sur la base de l'augmentation de plusieurs centaines de fois des niveaux de ce composé dans le LCR de patients souffrant de démence liée au SIDA (Heyes, Brew et al. 1991). Ce désordre est maintenant connu comme un trouble neurocognitif associé au SIDA et il est généralement réversible après le traitement de l'infection, ce qui entraîne la réduction des concentrations de QA (Kandaneeratchi and Brew, 2012). Les évidences suggèrent l'existence d'un composant inflammatoire dans la démence dans laquelle le QA peut être engagé en raison de sa capacité à induire l'expression de chimiocines telles que MCP-1 (protéine-1 chimioattractive monocytaire) et *rantes* (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) (Guillemin et al. 2003). Ces molécules pro-inflammatoires sont produites par des cellules immuno-compétentes dans la périphérie et par microglie dans le SNC. Une plus forte action de la MCP-1 attire et active les macrophages qui libèrent QA et de puissantes cytokines inflammatoires, y compris le TNF α . Le QA peut cependant lancer et promouvoir le développement d'une inflammation locale du SNC, situation qui peut provoquer des dommages cérébraux conséquents. Le QA produit aussi une activation gliale et la libération de cytokines consistantes avec un rôle dans les processus inflammatoires et cytotoxiques qui se produisent dans la maladie d'Alzheimer (Ting et al. 2009). Des travaux récents suggèrent le rôle du QA dans l'accumulation des protéines tau hyperphosphorilées qui constituent les microfibrillaires entrelacées fréquemment observés dans cette maladie (Rahman, Ting et al. 2009).

La maladie d'Huntington, bien qu'elle soit très souvent diagnostiquée en raison de l'apparition de symptômes moteurs, peut être précédée par des anomalies cognitives. Les patients ayant une plus grande probabilité de développer cette maladie présentent des difficultés dans l'exécution de tâches comme *attentional set shifting* et la fluence verbale sémantique (Lawrence and Sahakian, 1998). Postérieurement ont été également suggérés des déficits de mémoire patron, de reconnaissance spatiale et des aspects de la mémoire visuelle (Lawrence, Watkins et al. 2000). La majorité des altérations cognitives sont engagées avec le corps strié, et consistent en l'apparition de symptômes moteurs causés par la neurodégénération striale. La libération striale de QA produit un profil de changements neurochimiques, électrophysiologiques et comportementaux qui imitent celles que l'on observe chez les patients ayant la maladie d'Huntington. Les enzymes IDO et KMO sont aussi plus actives chez des patients dans les phases plus avancées de cette pathologie (Stoy et al. 2005, Sathyaikumar, Stachowski et al. 2010).

Le KA est un résultat du métabolisme du Trp produit par la transamination de KUN par la KAT. Ce métabolite est un antagoniste des récepteurs NMDA et peut aussi bloquer la neurotransmission excitatrice des autres récepteurs ionotropiques, comme les récepteurs de caïnate et les récepteurs AMPA (Perkins and Stone, 1982). Les lieux additionnels de l'action de KA ont été rapportés récemment, tels que le récepteur d'hydrocarbonate aromatique et le récepteur GPR 35 accouplé à la protéine G (Wang, Simonavicius et al. 2006; Di Natale, Murray et al. 2010). En outre, KA est un antagoniste non compétitif des récepteurs $\alpha 7$ nAChRs, lequel semble être une des principales cibles de KA dans le cerveau (Schwarcz, Bruno et al. 2012). Le KA a une fonction antioxydante et proportionne une neuroprotection contre des lésions excitotoxiques induites par KA (Sapko, Guidetti et al. 2006). On a établi son action protectrice contre l'ischémie cérébrale (Cozzi, Carpenedo et al. 1999). Le potentiel thérapeutique de KA comme agent neuroprotecteur a été pris en compte, quoique son application soit limitée en raison de sa faible capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (Fukui S et al. 1991).

L'augmentation des niveaux cérébraux de KA produit des altérations comportementales et cognitives semblables à celles rencontrées en conditions psychiatriques. On doit en souligner les effets dans le processus sensoriel qui sert d'exemple à des changements dans l'inhibition par pré-impulsion de stimulus auditifs (Nilsson et al. 2006). Ce phénomène a grandement retenu l'attention, du fait que, quoiqu'il arrive en diverses maladies

psychiatriques, il est particulièrement proéminent dans la schizophrénie, et est réduit par traitement avec des drogues antipsychotiques. Sa concentration dans le cerveau peut être substantiellement augmentée par simple administration de son précurseur KYN, qui traverse facilement la barrière hémato-encéphalique, ou à travers l'inhibition de l'enzyme KMO (Röver et al. 1997). L'inhibition de la KMO par conséquent augmente la quantité de KYN disponible pour la transamination en KA. La facilité avec laquelle les niveaux endogènes de KA peuvent être augmentés pour altérer l'inhibition par pré-impulsion favorise la conception selon laquelle une altération pathologique dans la voie de KYN pourrait être engagée dans des dysfonctions psychiatriques et de cette façon elle est liée à diverses perturbations cognitives (Erhardt et al. 2004; Nilsson et al. 2006).

Les augmentations de niveaux de KA ont été également associées aux déficits de mémoire spatiale et de travail (Chess, Simoni et al. 2007; Chess, Landers et al. 2009), aux déficiences dans le *sensory gating* (Shepard, Joy et al. 2003) et à la réduction de la neurotransmission glutaminergique (Konradsson-Geuken, Wu et al. 2010). Outre la mémoire spatiale, les niveaux de KA modulent également le processus de la stimulation conditionnée et de la discrimination contextuelle (Chess and Bucci, 2006). Plus récemment, l'attention s'est déplacée vers des tests plus sophistiqués d'accomplissement cognitif. L'augmentation des niveaux de KA par injections de KYN produit des perturbations de l'attention dans le *set-shifting test* (Alexander et al. 2012). L'inhibition de l'enzyme KAT produit une substantielle réduction (approximativement 70%) de la concentration extracellulaire de KA dans le système nerveux central de rats, et ceci est accompagné d'une augmentation de l'accomplissement cognitif dans une variété de tâches comportementales, y compris l'exploration, la reconnaissance d'objets et l'apprentissage (Potter, Elmer et al. 2010).

La réduction des niveaux de glutamate extracellulaire par KA s'accompagne d'une diminution dans l'accomplissement de souris ou de rats en tests de fonction cognitive, tels que *water-maze test for visuospatial memory and passive avoidance paradigms*, alors que l'inhibition de KAT et la réduction qui en résulte des niveaux de KA produit une augmentation de la libération de glutamate et provoque un meilleur accomplissement dans l'exécution de ces tâches, comme dans l'exploration d'objets, la reconnaissance d'objets et la discrimination spatiale. Ces comportements ont été associés à l'augmentation de la plasticité synaptique au niveau cellulaire, qui se reflète dans la plus grande LTP dans l'hippocampe *in vitro* (Pocivavsek, Wu et al. 2011).

L'association de la dépression avec l'augmentation de la production de cortisol et de facteurs inflammatoires a déjà été décrite (Leonard and Myint, 2009). L'activation de l'enzyme IDO aussi bien que celle de la TDO aboutissent aux mêmes conséquences : 1) déficience de la synthèse de 5-HT (et de ses métabolites, mélatonine, N-acétylsérotonine), ce qui contribue à l'insomnie, à la dérégulation des rythmes biologiques et à la neurogenèse perturbée qu'on observe dans la dépression (Oxenkrug and Requintina, 2003; Oxenkrug, 2011; Oxenkrug and Ratner, 2012); 2) une plus importante synthèse de KYN et de ses dérivés neuroactifs qui exercent des effets anxiogènes, pro-oxydatifs et se répercute dans l'engagement cognitif typique de la dépression (Lapin, 1973).

Si les altérations le long de la voie KYN sont engagées dans des anomalies du SNC chez l'adulte et agissent fortement sur la physiologie de diverses maladies qui atteignent le cerveau, actuellement diverses questions se posent pour savoir si les altérations dans les phases précoces de la vie ou même dans la période périnatale, associées aux conditions qui affectent la mère, pourraient influencer le SNC et ainsi la fonction cognitive des enfants à long terme.

2.3.4 Kynurénines et développement cérébral

Certaines études montrent que l'inhibition périnatale dans la voie de la KYN avec Ro61-8048, un inhibiteur sélectif de la KMO, produit des altérations dans la morphologie des neurones de l'hippocampe, dans la densité synaptique et dans la localisation immunocitochimique des protéines liées au développement cérébral des petits âgés de soixante jours (Khalil, Pizar et al. 2014). En outre, l'activation du système immunologique en raison de l'exposition périnatale à l'infection virale, peut sélectivement altérer l'expression de nombreuses protéines engagées dans les phases précoces de la neurogenèse, dans l'orientation axonale et dans la formation de synapse cérébrale chez les petits d'animaux âgés de 21 jours après la naissance (Forrest, Khalil et al. 2012). Les altérations observées incluent la diminution de l'expression de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDAR, altérations en *morphogenetic protein sonic hedgehog* et dans les niveaux de α -synuclein, combinées avec une augmentation de l'expression de la TPH (Forrest, Khalil et al. 2012).

Des rates gravides ont été traitées dans la période périnatale avec Ro61- 8048 et l'on a observé une substantielle augmentation (dix fois) des niveaux cérébraux de KA en liaison avec une altération de l'expression des sous-unités GluN2A et GluN2B dans le cerveau des

embryons (Forrest, Khalil et al. 2013). En outre, à 21 jours de vie post-natale, il y a eu une augmentation de la densité de la protéine PSD-95 et dans les niveaux de *sonic hedgehog*, ainsi qu'une augmentation dans l'expression de *doublecortin* et de l'antigène nucléaire des cellules en prolifération (Forrest, Khalil et al. 2013). La quantité totale et la proportion entre les différentes sous-unités des récepteurs de glutamate sont considérées critiques dans les fonctions synaptiques, dans la plasticité et dans la neurodégénération (Hardingham and Bading, 2011).

Des études postérieures ont corroboré ces découvertes (Pisar, Forrest et al. 2014). Les altérations moléculaires dans les périodes précoces du développement cérébral ont été associées à l'augmentation de l'excitabilité neuronale dans la période post-natale, facteur qui est considéré critique dans certains aspects de la fonction cognitive (Forrest et al. 2013). Une liaison importante entre ces diverses altérations et le comportement a été indiquée dans une étude qui montre que l'administration de KYN à des rats durant l'adolescence peut mener à des déficiences dans le comportement social à l'âge adulte, tandis qu'un traitement identique chez les adultes ne présente pas un tel effet (Trecartin and Bucci, 2011). Le traitement avec KYN avant et immédiatement après la naissance produit non seulement une augmentation des niveaux de KA, mais produit aussi une dysfonction cognitive significative (altération de l'attention et de la mémoire) dans l'âge adulte (Pocivavsek et al. 2012; Alexander et al. 2013). L'apprentissage et la mémoire semblent aussi être sensibles au traitement avec KYN durant l'adolescence (Akagbosu, Evans et al. 2012) et dans la vie adulte (Chess, Landers et al. 2009). Dans l'étude de Iaccarino et al. (2013), l'on a observé que des rats traités avec KYN entre 7 et 10 jours post-natales, présentent une augmentation des métabolites KA et QA durant le traitement, et une altération dans le comportement social et l'activité locomotrice une fois adultes (Iaccarino, Suckow et al. 2013).

On manque réellement d'études qui abordent les altérations du métabolisme de la KYN résultant de la dénutrition durant le développement fœtal. Jusqu'à maintenant, il y a à peine une étude qui ait pris comme objectif de déterminer si le métabolisme du Trp est affecté par la restriction de la croissance intra-utérine de fœtus exposés à la dénutrition protéique maternelle (Sano, Ferchaud-Roucher et al. 2014). Les auteurs quantifient les concentrations de Trp, KYN, 5-HT et de QA dans le plasma et les tissus des fœtus et des mères dans les périodes E13 et E20. Ils observent que la concentration de 5-HT est réduite chez les mères qui peuvent réagir à la sécrétion d'insuline et ainsi altérer le métabolisme des carbohydrates. En

outre, la concentration de 5-HT à partir de différentes sources comme le plasma maternel, le plasma fœtal et le plasma ombilical, a été moindre, alors que la concentration de QA a été deux fois plus forte chez les animaux dénutris en E20, et que cela pouvait être neurotoxique pour le cerveau du rat. Les auteurs suggèrent que de telles altérations durant le développement puissent perturber la synthèse de NAD chez les animaux exposés à la diète maternelle pauvre en protéines, conduisant à des changements épigénétiques qui peuvent être liés à l'augmentation de la susceptibilité de maladies chez les bébés quand ils atteindront l'âge adulte (Sano, Ferchaud-Roucher et al. 2014) et ils sont actuellement considérés comme un ensemble de processus d'expression et transmission de l'information génétique, y compris la transmission transgénérationnelle.

2.4 Transmission transgénérationnelle de la programmation métabolique

Un élément-clef de la programmation est l'existence d'effets trans-générationnels, par quoi une exposition à divers facteurs au début de la vie peut affecter la santé non seulement de la première génération, mais aussi des générations futures. Diverses études prospectives fournissent des évidences convaincantes que l'exposition maternelle peut avoir sur la santé de la descendance des effets permanents qui se perpétuent à travers les générations (Heijmans et al. 2008). Un bon exemple en serait la deuxième génération (F2) de descendants de la famine hollandaise (1944), dans laquelle les bébés, dont les grand-mères maternelles avaient traversé une période de famine durant la grossesse, ont présenté un plus grand indice pondéral comparé aux contrôles, ce qui fournit la preuve d'un effet transgénérationnel (Painter, Osmond et al. 2005).

Les modèles des animaux ont fourni des évidences de programmation transgénérationnelle sur divers phénotypes de maladies. Torrens et ses collègues ont démontré que des rats exposés à un bas taux de protéine au cours de la gestation peuvent transmettre une hypertension et une dysfonction endothéliale mésentérique à la génération F2 (Torrens et al. 2008). Bertram et al. ont également recherché les effets transgénérationnels de la restriction de nutriments durant la grossesse en paramètres cardiovasculaires et fonction hypothalamo-hypophyse-adrénal chez les animaux (Bertram et al. 2008). Ils ont suggéré que les descendants mâles de femelles F1 exposées à une restriction alimentaire précoce ont présenté une hypertension à l'âge adulte et une plus grosse épaisseur de la paroi du ventricule gauche. D'autres études ont par la suite rapporté l'augmentation de la pression artérielle et le nombre réduit de néphrons dans deux générations de rats descendants de mère ou de père qui

avaient été exposés à la restriction protéique dans la période pré-natale (Harrison and Langley-Evans, 2009). Dans cette étude, n'ont pas été observés d'effets sur la génération F3, ce qui suggérerait que le dommage initial avait un impact sur le fœtus de la génération F1 et les cellules germinatives qui forment la génération F2. La transmission d'une dysfonction cardiovasculaire a été également observée dans un modèle de rat avec pré-éclampsie, où la réduction de la perfusion utérine aboutit à l'élévation de la pression sanguine et à une hyperresponsivité vasoconstrictrice dans les deux générations suivantes (Anderson et al. 2006).

D'autres études ont également étudié le métabolisme altéré du glucose et de l'insuline chez les descendants mâles et femelles de la génération F2 dont les grands-mères avaient été exposées à de bas niveaux de protéine durant la gestation (Zambrano et al. 2005). En outre, dans une étude sur la restriction calorique maternelle, le faible poids à la naissance a été transmis à la génération F2, et ces descendants ont développé des difficultés dans la tolérance au glucose et une dysfonction des cellules- β du pancréas (Jimenez-Chillaron et al. 2009). Des descendants des génération F2 et F3 de sexe masculin ont présenté un poids réduits du pancréas en relation à la naissance, avec la réduction du volume des îlots et de la masse des cellules- β dans le premier et le 21^{ème} jour après la naissance, et ont été hyperinsulinémiques au 21^{ème} jour (Frantz et al. 2011). Les effets sur la génération F3 suggèrent une transmission intergénérationnelle des facteurs de risques de maladies métaboliques à travers d'autres mécanismes différents de l'exposition directe des gamètes. Des études renforcent ces résultats, où les effets du métabolisme du glucose ont été étendus à la génération F3 (Benyshek et al. 2006). En outre, les études essaient de caractériser le rôle que les deux voies, maternelle et paternelle, jouent dans la transmission intergénérationnelle de la programmation. La grande étude *British National Child Development* a montré les effets de la programmation sur le poids à la naissance dans la troisième génération (F3), celui-ci étant transmis par la voie maternelle (Alberman et al. 1992), tandis que Kaati et ses collègues ont suggéré la transmission de maladies cardiovasculaires et de diabète jusqu'à la génération F2 de grands-pères qui avaient été soumis à de faible disponibilité d'aliments durant leur enfance (Kaati et al, 2002).

2.4.1 Transmission par la ligne paternelle

Des études expérimentales montrent que la transmission des effets de la programmation à travers la ligne paternelle sont moins communs que ceux qui recherchent la transmission maternelle. L'intolérance au glucose dans les génération F1 et F2 a été

démontrée en réponse à l'excès de nutrition paternelle dans la génération F0 (Pentinat et al. 2010). L'exposition paternelle F0 à une diète riche en graisses a altéré aussi l'épigénome du sperme dans les générations suivantes (Fullston et al. 2012). Des mâles de la génération F0 exposés à une diète pauvre en protéine ont influencé la génération F2, montrant des altérations dans la méthylation du DNA en divers points des cellules du foie, y compris des points potentiellement engagés dans la régulation du métabolisme lipidique (Carone et al. 2010). Il y a peu d'évidences publiées sur les modèles hypocaloriques ou non-alimentaires sur la transmission de phénotype métaboliques à travers la ligne paternelle, encore qu'un effet de réduction dans l'expression cérébrale de microRNA de la génération F2 en réponse à l'exposition paternelle au stress dans la génération F0 ait déjà été objet de recherche (Morgan and Bale, 2011). On peut formuler l'hypothèse que la modification épigénétique est l'explication la plus acceptée pour la transmission des effets de programmation à travers la ligne paternelle. D'autres influences paternelles ont également été supposées, comme par exemple à travers la transmission de prion de virus ou de microRNA (Ostermeier et al. 2004).

2.4.2 Transmission par la ligne maternelle

Un plus grand nombre d'études a démontré les effets de programmation transgénérationnelle transmis à travers la ligne maternelle (Pinto et Shetty, 1995; Lam et al. 2000; Pinheiro et al. 2008; Peixoto-Silva et al. 2011; Nascimento et al. 2012). Une diète maternelle riche en graisses est reliée aux phénotypes dans la génération F2, y compris l'intolérance au glucose et la dysfonction pancréatique (Gniuli et al. 2008). La génération F2 cependant ne semble pas montrer d'effets contraires en termes de facteurs de risques cardiovasculaires observés dans la génération F1 (Armitage et al. 2007). Une série de résultats a été montrée en réponse à la restriction de protéines dans la diète de femelles F0, y compris des effets sur le métabolisme du glucose et de l'insuline (Zambrano et al. 2005; Benyshek et al. 2008; Pinheiro et al. 2008; Peixoto-Silva et al. 2011), l'adiposité (Peixoto-Silva et al. 2011), la méthylation du DNA du foie (Burdge et al. 2007), (Frantz et al. 2011), le nombre de néphrons (Harrison and Langley-Evans, 2009), des effets cardiovasculaires (Torrens et al. 2008; Harrison and Langley-Evans, 2009) et la réduction du nombre de cellules beta dans les générations F1 et F2 (Blondeau et al. 2002).

Il existe diverses lignes qui expliquent certains mécanismes responsables pour les effets transgénérationnels maternels : la transmission à travers l'altération épigénétique (aussi bien somatique que de la ligne germinative) (Ozanne and Constância, 2007), la transmission à

travers les composants de l'ooplasma (particulièrement des mitochondries) (Knudsen and Green, 2004) ou à travers le développement d'une ambiance utérine hostile présente dans la génération F1 programmée (figure 8).

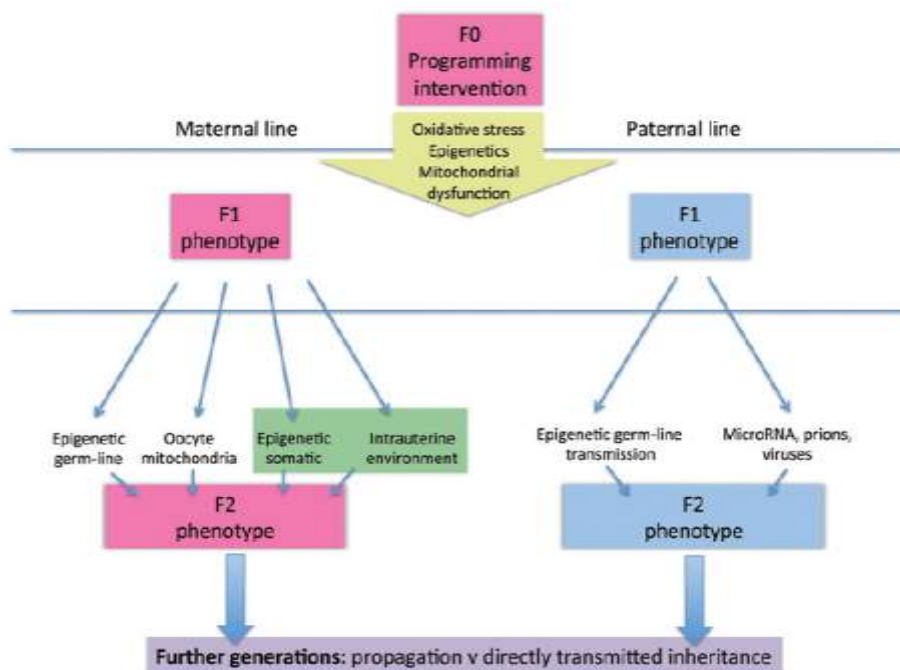


Figure 8: Mécanisme potentiel de programmation transgénérationnelle. Voie maternelle (rose) et voie paternelle (bleu).

2.4.2.1 Voies de transmission: altérations épigénétiques

Des modifications épigénétiques engagent dans la fonction de gènes des changements héréditaires qui ne dépendent pas des altérations dans la séquence du DNA. Elles peuvent inclure la méthylation du DNA et la modification de l'histone qui normalement sont établies au début du développement mais qui peuvent arriver en réponse à des stimulations environnementales à long terme (Reik et al. 2001). L'attention des chercheurs s'est focalisée en grande partie sur les changements dans les patrons de la méthylation du DNA provoqués par des stimulations environnementales, qu'elles soient nutritionnelles ou autres (Burdge et al. 2007, 2011, Crudo et al. 2012). La méthylation a lieu à travers la liaison de groupes méthyl dans les résidus de cytosine du DNA (Yang et al. 2004). On postule que la disponibilité alimentaire peut altérer les patrons de la méthylation et des altérations épigénétiques transmissibles pour la génération F1 (Morgan et al. 1999; Waterland and Jirtle, 2003).

La programmation qui passe par la modification des histones, y compris la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation, qui peuvent toutes altérer l'interaction entre les histones et le DNA pour altérer l'expression génique (Zentner and Henikoff, 2013). Des altérations dans la modification des histones ont été démontrées comme un résultat de l'exposition aux métaux lourds, comme l'arsenic (Zhou et al. 2008) et le nickel (Broday et al. 2000)], *in vitro*.

Des études sur les rongeurs fournissent les preuves qu'une modification épigénétique somatique peut aussi être transmise de mère à fils à travers des aspects comportementaux maternels durant la période post-natale. Le travail de Weaver et al. (2004) a montré que de hauts niveaux de soin et de propreté de la mère entraîne des altérations épigénétiques (à la fois méthylation du DNA et modification de l'histone) des petits, provoquant une réponse moins aiguë aux glucocorticoïdes et au stress de la vie adulte. De telles modifications épigénétiques peuvent se perpétuer entre les générations à travers des mécanismes comportementaux (Champagne et al. 2006). Ainsi les petits de mère qui présentent de hauts niveaux de soin et d'hygiène peuvent développer par la suite ces comportements avec leurs nichées (Francis et al. 1999).

2.4.2.2 Voies de transmission: *Ooplasm*

Malgré la contribution importante du mécanisme des effets transgénérationnels pour des modifications épigénétiques, il est également important de tenir compte du rôle des aspects non-génomiques de la physiologie embryonnaire et fœtale, comme par exemple la contribution de la mitochondrie. Les mitochondries et le DNA mitochondrial hérité sont dérivés du cytoplasme des ovocytes chez les humains et les rongeurs, et par conséquent hérités à travers la ligne maternelle (Cummins, 2002). Le DNA mitochondrial change drastiquement à l'intérieur des tissus individuels en réponse au stress oxydatif durant la gestation, et par conséquent pourrait fournir un mécanisme pour la programmation par l'intervention diététique maternelle (Aiken et al. 2008). Au préalable il a été démontré que les rats alimentés en diète riche en graisse montrent une altération dans la biogenèse de l'ovocyte mitochondrial et l'état redox, proportionnant un mécanisme potentiel pour la transmission d'effets de programmation à travers le cytoplasme (Igosheva et al. 2010).

2.4.2.3 Voies de transmission: *ambiance gestationnelle hostile*

Le rôle de l'ambiance intra-utérine dans l'établissement du phénotype des générations futures est démontré par des études de transferts d'embryons contrôle dans des ambiances utérines anormales. Le transfert d'embryons contrôle dans des utérus hyperglycémiques favorise un phénotype de diabète chez le descendant adulte (Randall-Gill et al. 2004). De la même façon, le transfert d'embryons contrôle pour des utérus de rats soumis à une déficience de ghréline cause une implantation perturbée, résultat dû probablement à la prolifération défectueuse de l'endomètre dans l'utérus de la génération F1 (Martin et al. 2011). D'un autre côté, le phénotype d'une deuxième génération de rats soumis à la restriction calorique peut être *sauvé* par le transfert de blastocyte d'un utérus contrôle (Garg et al. 2012). Ces résultats suggèrent que l'utérus n'est pas un partenaire passif dans l'établissement du phénotype de la génération F2 et qu'une modification du lignage germinatif n'est pas nécessaire pour transmettre un phénotype de programmation en présence d'un appareil reproducteur compromis. Des adaptations vasculaires utérines dans la grossesse normale sont perturbées par l'influence aussi bien de la restriction alimentaire maternelle (Hemmings et al. 2005), que de la diète maternelle pauvre en protéine (Torrens et al. 2003). Une altération dans la prolifération endométriale a été observée chez des rats de la génération F1 avec une déficience de ghréline (Martin et al. 2011). Cette altération peut nuire à la fonction reproductive de F1 et créer une ambiance altérée pour perpétuer un phénotype de programmation dans la génération F2.

La contribution de la physiologie de la propre gestation peut contribuer à un phénotype différencié. Les demandes physiologiques d'une grossesse ont été vues comme un « test de stress » (Verier-Mine, 2010; Bilhartz et al. 2011). Des animaux programmés peuvent cesser de répondre aux défis de la gestation en raison de la diminution de la réserve physiologique, même si l'appareil reproducteur n'en est pas affecté en lui-même. Des animaux F1 ayant un phénotype relativement normal hors de la grossesse, peuvent cependant mal s'adapter à la gestation, et par la suite transmettre des effets adverses pour une génération F2. Cet effet est mieux décrit dans le diabète gestationnel (Aerts and Van Assche, 2006), où sont bien compris les effets de l'hyperglycémie maternelle sur la descendance en développement dans l'utérus. La transmission du diabète gestationnel pour une génération F2 à travers la mère fut un des phénotypes transgénérationnels les plus précocement décrits (Gauguier et al. 1990). D'autres aspects systémiques de la physiologie de la gestation, y compris la distribution du débit cardiaque (Ahokas et al. 1984) et des adaptations vasculaires (Brawley et al. 2004), sont également altérés par les interventions dans la diète maternelle.

Devant cet exposé, établir une adaptation maternelle adéquate à la gestation peut être un élément crucial dans la détermination de l'ambiance de vie précoce visant celle à quoi seront soumises les générations suivantes. En outre, la définition des mécanismes de la transmission transgénérationnelle de la programmation métabolique est un domaine qui a besoin de plus de recherches, avec des implications sur le thème de la programmation comme sujet majeur d'étude.

Objectifs

3 Objectifs

3.1 Objectif général

L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'impact à court terme et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral.

3.2 Objectifs spécifiques

- Effectuer une analyse quantitative des voies métaboliques du tryptophane dans le *forebrain* et l'*hindbrain* d'embryons contrôles et dénutris avec 13 et 17 jours de vie intra-utérine.
- Déterminer le niveau d'expression génique des enzymes IDO, TPH2 et KMO dans le *forebrain* et l'*hindbrain* d'embryons contrôles et dénutris avec 17 jours de vie intra-utérine.
- Quantifier les métabolites du tryptophane dans le tronc cérébral, l'hippocampe et le cortex pré-frontal d'animaux contrôles et dénutris de la première génération.
- Déterminer le niveau d'expression génique des enzymes IDO, TPH2 et KMO dans le cortex, le tronc cérébral et l'hippocampe d'animaux contrôles et dénutris de la première génération.
- Quantifier les métabolites du tryptophane dans l'hippocampe et le cortex pré-frontal d'animaux contrôles et dénutris de la deuxième génération.
- Tracer les caractéristiques phénotypiques et le profil métabolique des animaux adultes contrôles et dénutris de deuxième génération.

Matériels et méthodes

4 Matériels et méthodes

4.1 Comité d'éthique

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le "Comité d'éthique Pour l'expérimentation animale, Pays de la Loire, France" et par le Comité d'éthique pour la recherche sur les animaux de conduite Centre des sciences de la vie de l'Université fédérale de Pernambuco (UFPE). Les études chez le rat ont été réalisées selon les normes de l'unité de l'expérimentation animale Nantes (conformément à la Directive des Communautés européennes du 24 Novembre 1986 (86/609 / CEE) et les Principes de soins des animaux de laboratoire (NIH publication no. 85-23, révisé 1985).

4.2 Animaux et diètes

Pour les expériences, nous avons utilisé des rates Wistar-Han vierges, âgées de 60 jours et pesant 210 ± 20 g, provenant fournisseur Charles-River (France) et du Fonds de nutrition animale de l'Université fédérale de Pernambuco. Les femelles ont été accouplées avec des mâles du même âge, de la même souche et du même fournisseur. Les animaux ont été maintenus à une température ambiante expérimentale de 22 ± 2 ° C, et le cycle Lumière / Obscurité était de 12/12 heures (lumière 7h00-19h00, obscurité 19:00-07h00). L'accès à l'eau était totalement libre et l'alimentation de base était fourni par : vivarium standard (Ration SAFE® - A04, 18% de protéine). Le diagnostic de l'état de grossesse a été réalisé par prélèvement vaginal. La grossesse confirmée, les rats ont commencé à recevoir les rations expérimentales conduisant à deux groupes: contrôle (C), les rats ont reçu une alimentation protéique normal (17%) ou insuffisante (régime hypoprotéique ; PR - Protéines restreint à 8 %). Les régimes étaient isocaloriques, et ont suivi les recommandations de l'AIN-93G ; REEVES, Nielsen et Fahey, (1993) comme décrits dans le Tableau 1. Les régimes expérimentaux ont été maintenus tout au long de la grossesse et l'allaitement. Un jour après la naissance, les ratons ont été pesés et choisis, formant la litière avec 8 ratons et la mère (5 mâles et 3 femelles). Après sevrage, les ratons ont commencé à recevoir un régime d'entretien (Ration SAFE® - A04, protéine 18%) et ont été logés dans des cages avec un maximum de quatre animaux.

Tableau 3. Composition des diètes à faible teneur protéique ou témoin

Composé	Diète Témoin	Diète Hypoprotéique
---------	--------------	---------------------

g%	100,00	100,00
Protéine (Caseïne)	18,00	8,10
Carbohydrates	65,20	75,10
Lipides	7,00	7,00
Cellulose	5,00	5,00
Vitamines	1,00	1,00
Minéraux	3,50	3,50
Méthione	0,30	0,30
% Kcal	3,6 Kcal/g	3,6 Kcal/g

Toutes les procédures ont été effectuées en conformité avec les directives de la Communautés européennes et du Conseil du 24 Novembre 1986 (86/609 / CEE) en relation avec le soin et l'utilisation des animaux dans des procédures expérimentales. Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale.

4.3 Conception expérimentale

4.3.1 Obtention des embryons

Les 13ème et 17ème jours de gestation, les rats gestantes de chaque groupe expérimental (contrôle et dénutri) ont été anesthésiés avec 2% d'isoflurane. Le pourcentage d'isoflurane a été modulé en fonction des réactions de l'animal (taux et l'étendue des mouvements spontanés et les mouvements de respiration). Chaque fœtus ont été extraits par césarienne. Le cerveau de chaque fœtus a été disséqué et divisé en prosencéphale et rhombencéphale. Les mères ont été sacrifiées par dislocation cervicale.

4.3.2 Obtention des animaux de la première génération

Un autre groupe des rats gestantes a été nourries soit avec un aliment standard soit avec un aliment isocalorique appauvri en protéines pendant tout au long de la grossesse et lactation. Vingt-quatre heures après la naissance, les ratons ont été sélectionnés et répartis au hasard formant portées avec huit ratons dans un rapport de 1 à 1 entre les hommes et les femmes. Au sevrage (21 jours), tous les rats ont été nourris avec un régime alimentaire standard de laboratoire. À l'âge de 210 jours, une partie des ces animaux ont été sacrifiés dans

un milieu enrichi par CO₂, puis par dislocation cervicale. Le cortex préfrontal, le tronc cérébral et l'hippocampe sont disséqués et conservés à -80 ° C jusqu'à l'analyse. Une autre partie de ces animaux a été sacrifiée, une autre partie de ces animaux a été utilisée pour obtenir les animaux de seconde génération.

4.3.3 Obtention des animaux adultes de la deuxième génération

Pour obtenir des animaux de deuxième génération (F2), des petits de première génération (F1) ont été accouplés de la façon suivante : des animaux de sexe féminin de première génération F1 de chaque groupe expérimental (contrôle et dénutris) ont été accouplés à 8 semaines d'âge avec des animaux de sexe masculin (contrôle) de la première génération F1, mais pas de la même mère. Ces rates en gestation ont été soumises aux mêmes manipulations expérimentales décrites dans la première étape du protocole, cependant elles ont toutes été alimentées avec une diète patron durant la gestation et la lactation. Après la naissance, les petits ont été randomisés pour former les groupes: contrôle F2 et dénutris F2. Le poids corporel des petits F2 a été évalué tous les 4 jours durant la lactation, et tous les 7 jours après le sevrage. Au 180^{ème} jour de vie, a été réalisée une analyse du profil métabolique, et aussitôt après ces animaux ont été sacrifiés dans une ambiance enrichie en CO₂, et a suivi le déboîtement cervical. Le cortex et l'hippocampe ont été disséqués et emmagasinés à - 80° C jusqu'à l'analyse. Le tissu adipeux a été retiré et pesé.

4.4 Manipulations expérimentales

4.4.1 Chromatographie liquide – Spectrométrie de masse

Les métabolites du L-tryptophane ont été quantifiés par spectrométrie de masse (Zheng et al. 2012). La chromatographie liquide a été réalisée sur l'appareil Aquity H-Class (Waters) et la colonne Acquity UPLC HSS T3 2,1mmx100mm, 1,7 µm (Waters). La détection des spectres de masse a été effectuée en utilisant le Xevo TQD (Waters). Les molécules ont été séparées à partir d'une phase mobile constituée de H₂O + 0,5% d'acide formique + 2,5 mM acétate d'ammonium (solvant A) et d'acétonitrile + acide formique à 0,5% + 2,5 mM acétate d'ammonium (solvant B) à un débit de 0,4 ml/min, pour atteindre des pressions allant de 20 à 35 MPa. Nous avons utilisé un profil de gradient, à partir de 99% de solvant A, ayant cette composition constante sur 6 minutes. Puis nous avons réduit de façon linéaire jusqu'à 75%.

Cette composition a été maintenue pendant 10 deuxièmes avant de retourner aux conditions initiales de 1,40 min. Le temps d'exécution totale était de 7,50 min. Les paramètres de l'ionisation des molécules analysées sont indiquées dans le tableau 2. Tryptophane ^{15}N a été utilisé comme standard interne. 50 mg de tissu a été broyé dans 190 μl H_2O + EDTA 2,7 mM + 1% d'acide formique + 10 μl de 50 mM Tryptophane ^{15}N . Après homogénéisation du tissu, 500 μl d'acétonitrile glacé était ajoutée et centrifugé à 12.000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et nous avons le laisse sécher sur un évaporateur d'azote pendant 30 minutes. Le reste du contenu a été mis en suspension dans 100 μl H_2O + 2,7 mM EDTA + 1% d'acide formique. Deux microlitres a été injectée dans le système chromatographique pour analyse.

Tableau 2. Paramètres de l'ionisation en mode positif (ESI +) pour la méthode de spectrométrie de masse.

Fonction	Nom	Ion Parent (Da)	Ion Fils (Da)	Dwell (s)	Cône (V)	Collision (V)
1	Nictinamide	122,84	80,035	Auto	54	18
2	Acide Nicotinique	123,84	77,653	Auto	38	18
3	Acide Anthranillique	137,853	120,028	Auto	16	10
4	Acide Quinolinique	167,904	150,026	Auto	20	8
5	Acide Dinicotinique	167,904	121,99	Auto	46	22
6	Serotonine	176,977	160,081	Auto	18	8
7	Acide Kynurenique	189,883	144,047	Auto	30	18
8	5-HydroxyIndole Acétique Acide	191,957	146,061	Auto	26	14
9	Tryptophane	205,004	188,044	Auto	14	8
10	Acide Xanthurenique	205,947	160,048	Auto	30	18
11	Tryptophane ^{15}N	207,004	189,071	Auto	20	8
12	Kynurenine	209,004	192,039	Auto	20	8

4.4.2 Real-time quantitative reverse transcription-PCR

L'ARN total du tissu cérébral a été extrait en utilisant le réactif Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), traité à la DNase (exempte de RNases) pendant 30 minutes à 37 ° C et ensuite purifié par le kit de purification de minicolonne NucleoSpin de Macherey-Nagel (Hoerd, France) selon les instructions du fabricant. La qualité de l'ARN a été vérifiée sur des gels d'agarose et la quantité déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoVueTM plus GE Healthcare à 260 et 280 nm. Ensuite, 1 mg d'ARN purifié a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant l'enzyme Superscript II RNaseH- transcriptase inverse (Invitrogen) dans un volume total de 20 μl . L'ADNc résultant a été dilué 40 fois dans de l'eau. Ensuite, 5 μl de chaque échantillon d'ADNc dilué a été utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR en utilisant SYBR Green (Biorad, Marnes la Coquette, France) sous forme de colorant fluorogène et le système de détection tel que le iCycler iQ PCR en temps

réel à partir de l'appareil CFX de BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Les paramètres de la PCR étaient: une dénaturation initiale de 5 minutes à 95 ° C suivie par 45 cycles de 30s et 30s à 95 C à 60 C. Nous avons calculé les amorces directe et inverse avec le logiciel Beacon Designer; Les détails ont été confirmés de façon indépendante avec le logiciel Blast. Les amorces ont été utilisées pour l'amplification: TPH2: Sense primer ATCCCAAGTTCGCTCAGTTTCTC, Anti-sense Primer ACGCCCGCAGTTGACCTTC. IDO: Sense primer ATGGCGTATGTGTGGAAC Anti-sense Primer TGCGTAAGACAGAATGGG, KOM: Sense primer GCTTCCAACGCATAGTGATG Anti-sense Primer GGCAGGCAACAGAAAGAAATC. L'expression relative des niveaux d'expression ont été calculées en utilisant la méthode comparative ACt (Livak and Schmittgen 2001).

4.4.3 Test de tolérance au glucose

Le test de tolérance au glucose a été réalisé à 180 jours de vie chez les animaux de deuxième génération. Après un jeûne de 16 heures, a été réalisée une première collecte de sang, nommée glycémie à jeûn (temps 0). Par la suite a été administré du glucose (une dose d'un gr par kg de poids corporel) par gavage, et d'autres échantillons de sang ont été recueillis après 20, 40, 60, 80, 100, 120 et 140 minutes. Les concentrations de glucose sanguin ont été indentifiées par lecture au moyen du glucosimètre (AccuCheck Active).

4.4.4 Prise alimentaire

La prise alimentaire de la diète hypercalorique a été réalisée à 180 jours de vie et obtenue par la différence entre la quantité offerte et la quantité rejetée nuit et jour durant 10 jours consécutifs. La consommation relative a été obtenue par la division de la consommation alimentaire (kcal) par le poids corporel (g).

4.4.5 Analyse de données.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ S.E.M. D'abord, nous avons appliqué le test de normalité (test de Kolmogorov-Smirnov). Les différences statistiques entre les groupes ont été évalués par test *t-Student* ou two-way ANOVA suivie par le test de Bonferroni. Le niveau de signification a été maintenu à 5% ($p < 0,05$). Les analyses des données ont été réalisées avec programme statistique Graphpad 5 Prism ® (GraphPad Software Inc, La Jolla, Californie, USA).

Résultats

5. Résultats

Une partie des résultats issus de ce travail est présentée sous forme d'article et une autre partie est rédigée comme résultats supplémentaires.

5.1 Article original

Journal of Neurochemistry



Maternal protein-restriction induces selective and opposite changes on kynurenine pathway metabolism in the offspring's foetal and adult brain

Journal:	Journal of Neurochemistry
Manuscript ID:	JNC-2016-0390
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	13-May-2016
Complete List of Authors:	Honorio de Melo Martimiano, Paula; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles; Universidade Federal de Pernambuco, Anatomia de Sa Braga Oliveira, André; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles; Universidade Federal de Pernambuco, Anatomia Ferchaud-Roucher, Véronique; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN) Croval, Mikael; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN) Ouquerram, Khadija; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN) Lopes de Souza, Sandra; Universidade Federal de Pernambuco, Anatomia Kaeffer, Bertrand; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN) Bolaños-Jiménez, Francisco; INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles (PhAN)
Area/Section:	Molecular Basis of Disease
Keywords:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

Maternal protein-restriction induces selective and opposite changes on kynurenine pathway metabolism in the offspring's foetal and adult brain

Paula Honório de Melo Martimiano^{1,2}, André de Sa Braga Oliveira^{1,2}, Véronique Ferchaud-Roucher¹, Mikaël Croyal¹, Khadija Ouguerram¹, Sandra Lopes de Souza², Bertrand Kaeffer¹, Francisco Bolaños-Jiménez¹.

¹UMR 1280 Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRA-Université de Nantes, Nantes France. ²Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Author for correspondence: F. Bolaños-Jiménez. CHU–Hôtel Dieu. HNB1–UMR PhAN. 1280 Physiologie des Adaptations Nutritionnelles. Place AlexisRicordeau 44096 Nantes. Cedex 1. France. Tel: 33-(0)-2-53 48 20 14. Fax: 33-(0)-2-53 48 20 03 Email: Francisco.Bolanos@univ-nantes.fr

Running title: Metabolic programming of tryptophan metabolism.

Key words: Kynurenine, Metabolic programming, Brain, Tryptophan, Serotonin, protein-restriction, Fœtus.

Abstract

Early malnutrition is a risk factor for depression and schizophrenia. Since the offspring of malnourished dams exhibit increased brain levels of serotonin (5-HT), a tryptophan-derived neurotransmitter involved in the pathophysiology of these mental disorders, it is considered that the deleterious effects of early malnutrition on brain function are due in large part to altered serotonergic neurotransmission resulting from impaired tryptophan (Trp) metabolism. However, tryptophan is also metabolized through the kynurenine (KYN) pathway yielding several neuroactive compounds including kynurenic (KA), Quinolinic (QA) and Xanthurenic (XA) acids. Nevertheless, the impact of perinatal malnutrition on brain kynurenine pathway metabolism has not been examined to date. Here we used ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous quantification of tryptophan and a set of seven compounds spanning its metabolism through the serotonin and kynurenine pathways, in the brain of embryos and adult offspring of rat dams fed a protein-restricted (PR) diet. Protein-restricted embryos showed reduced brain levels of Trp, serotonin and KA, but not of KYN, XA or QA. In contrast, PR adult rats exhibited enhanced levels of Trp in the brain stem and cortex along with increased concentrations of 5-HT, kynurenine and XA. The levels of XA and KA were also increased in the hippocampus of adult PR rats. These results show that early protein deficiency induces selective and long-lasting changes in brain kynurenine metabolism. Given the regulatory role of KYN pathway metabolites on brain development and function, these changes might contribute to the risk of developing psychiatric disorders induced by early malnutrition.

Introduction

A large body of epidemiological evidence indicates that malnutrition during in utero and/or neonatal development results in long-lasting learning deficits and a high risk of developing neurological and psychiatric disorders in later life such as depression and schizophrenia (Brown & Susser 2008, Xu *et al.* 2009, Brown *et al.* 2000, Costello *et al.* 2007). In rodents, the offspring of malnourished dams exhibit impaired learning (Tonkiss & Galler 1990, Fukuda *et al.* 2002) and enhanced behavioural responses to stress (Trzctńska *et al.* 1999, Levay *et al.* 2008) and these alterations are associated with a number of neuroanatomical and neurochemical changes including a reduced number of neurons and synaptic contacts (Granados-Rojas *et al.* 2002, Díaz-Cintra *et al.* 1991) along with an altered function of several neurotransmitter systems (Laino *et al.* 1993, Almeida *et al.* 1996). However, these experimental observations do not provide any information about the cause-effect relationship between the lack of one, or several, nutrients during the critical stages of development and disease susceptibility later in life.

Here we examined the potential involvement of tryptophan (Trp) on the psychiatric and neurological disorders induced by perinatal undernutrition. Trp is an essential amino acid that serves as precursor for the synthesis of several neuro-active compounds through the serotonin (5-HT) and kynurenine (KYN) pathways. Namely, 5-HT modulates cell proliferation and differentiation as well as neuronal migration and synaptogenesis during embryonic development (Gaspar *et al.* 2003, Bonnin & Levitt 2011). At adulthood, this neurotransmitter regulates learning and memory processes (Stiedl *et al.* 2015, Olvera-Cortés *et al.* 2013) and is involved in the pathophysiology of several neuropsychiatric diseases including anxiety (Albert *et al.* 2014), depression (Liliana *et al.*), schizophrenia ((Baou *et al.* 2016, Lin *et al.* 2015) and autism (Muller *et al.* 2016). Kynurenic acid (KA) and quinolinic acid (QA), two products of the KYN pathway, have also been associated with these neurological disorders as well as with Huntington's, Alzheimer's, and Parkinson's diseases due to their capacity to act as antagonist and agonist, respectively, of glutamate NMDA receptors (Réus *et al.* 2015, Sathyaikumar *et al.* 2011, Myint & Kim 2014, Maddison & Giorgini 2015b, Yang *et al.* 2014).

Previous studies have shown that protein or calorie restriction during gestation and/or lactation result in increased brain levels of serotonin (Mokler 1999; (Stern *et al.* 1975, Hernández *et al.* 1989, Miller *et al.* 1977). This indicates that the brain disorders exhibited by individuals malnourished in early life are due, at least in part, to altered tryptophan metabolism. However, in spite of the neurological effects of the kynurenine pathway metabolites and the fact that more than 90% of total body tryptophan is metabolised along this pathway (Leklem 1971, Gál & Sherman 1980), whether *in utero* and/or neonatal malnutrition alters the brain concentration levels of KYN and its metabolites has not been examined to date. To get a complete picture of the short and long-term effects of maternal malnutrition on Trp metabolism in the brain of the offspring, here we performed the simultaneous quantification, by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), of tryptophan and a set of seven compounds spanning its metabolism through the serotonin and kynurenine pathways in the placenta and brain of embryos and adult offspring of dams fed a low protein diet during gestation and lactation. In addition, to determine whether maternal protein-restriction induces selective effects on the serotonergic system, we quantified within the same samples and in the same analytical run, the concentration of dopamine (DA) and noradrenaline (NE), two compounds that, together with 5-HT, constitute the family of monoamine neurotransmitters. Like serotonin, DA and NE act as learning signals and have been associated with the physiological alterations underlying depression and schizophrenia (Hamon & Blier 2013, Carlsson & Carlsson 2006, Lechin & van der Dijs 2005).

Material and Methods

Animals and nutritional manipulations

All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the Principles of laboratory animal care (NIH publication no. 85–23, revised 1985), and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Pays de la Loire (CEEA PdL 2012.182)

Virgin female Wistar rats weighing 200–220 g were obtained from Charles River (France) and mated to 3-month-old males of the same strain. After confirmation of mating, pregnant rats were housed individually and fed *ad libitum* either a control (170 g protein / Kg) or an

isocaloric low-protein (LP) diet (80 g protein / Kg). The diets were provided by the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco (Brazil) and their composition has been described previously (Nascimento *et al.* 2013). The day on which the dam was determined to be sperm positive was considered embryonic day 1 (E1). Animals were maintained in an environmentally controlled clean air room with a temperature of $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a 12 h dark /12 h light cycle for the duration of the experiment.

Tissue sampling

At E13 and E17, a set of pregnant rats from each experimental group, control (C) and protein-restricted (PR), were anesthetized with 2% isoflurane. Fetuses and placenta of each female were then extracted by cesarean section. The brain of each fetus was dissected and divided into forebrain and hindbrain and immediately frozen together with the placenta samples in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis. In addition, a blood sample was collected from the dams by cardiac puncture before their sacrifice by cervical dislocation. The remaining dams continued to be fed the control or the low protein diets through gestation and lactation. One day after birth, litter size was adjusted at random to eight pups per dam maintaining an equal sex ratio. At weaning (21 days), all control and PR pups were fed standard chow until the end of the experiment. At 7 months of age, animals were sacrificed by exposure to a CO_2 enriched atmosphere followed by cervical dislocation. The cortex, brain stem and hippocampus were dissected, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. At the end, a total number of 12 control dams (6 for foetus and 6 for adults), and 12 PR dams (6 for foetus and 6 for adults), were used, such that the presented results correspond to the combined data from six animals born to six different dams.

Chemicals and reagents.

Water, acetonitrile, methanol, formic acid, EDTA and ammonium acetate were obtained from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). L-tryptophan (TRP), $^{15}\text{N}_2$ -L-tryptophan ($^{15}\text{N}_2$ -TRP), quinolinic acid (QA), L-kynurenine (KYN), 5-hydroxy-indole acetic acid (5-HIAA), kynurenic acid (KA), serotonin (5-HT), nicotinic acid (NA), xanthurenic acid (XA), caffeic acid (CA), 2-chloroadenosin (2-CAD), dopamine (DA), noradrenalin (NE) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were dissolved in methanol

containing 0.1% of formic acid to reach concentrations at 20 mM. These working solutions were stored as single-use aliquots at -20 °C.

Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

We used a Xevo TQD Mass Spectrometer with an electrospray (ESI) interface and an Acquity H-Class UPLC™ device (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and the methodology developed by Zheng et al., (Zheng *et al.* 2012) for the simultaneous quantification of tryptophan and a set of eight compounds spanning its metabolism through the serotonin and kynurenine pathways (**Figure 1**). The concentrations of the neurotransmitters dopamine and noradrenalin were also determined within the same samples and in the same analytical run

In brief, 50 mg of placenta or brain tissue were homogenized in 200 µl of an ice-cold extraction solution containing 2.7 mM EDTA, 1% formic acid and a pool of exogenous internal standards at the following concentrations: 50 µM ¹⁵N₂-TRP, 200 µM CA and 5 µM 2-CAD. Thereafter, 500 µL of ice-cold acetonitrile were added to the homogenate and, after centrifugation at 15,000 g for 15 min, the supernatant was recuperated and evaporated to dryness under a nitrogen stream at room temperature. The same extraction protocol was used for the analysis of the circulating levels of the kynurenine pathway metabolites using 50 µl of plasma. To generate calibration curves, standard solutions were prepared in the same way by serial dilutions of compounds (TRP, DA, QA, NE, 5-HT, KYN, NA, 5-HIAA, KA and XA) in 2.7 mM EDTA aqueous solution containing 0.1% of formic acid. Calibration ranges are detailed in the **supplemental Table S-1**. Dried samples were then dissolved in 100 µl of 2.7 mM EDTA aqueous solution containing 0.1% of formic acid and 2 µl of samples were injected into the LC-MS/MS system for analysis.

Compounds were separated on an Acquity HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm, Waters) at 30 °C with a linear gradient of mobile phase B (acetonitrile containing 0.5% formic acid and 2.5 mM ammonium acetate) in mobile phase A (water containing 0.5% formic acid and 2.5 mM ammonium acetate) and at a flow rate of 400 µl/min. Mobile phase B (1%) was linearly increased to 25% for 6 min, then returned to the initial condition for 10 seconds, and kept constant for 1.40 min prior the next injection. Compounds were then detected by the mass spectrometer with the ESI interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3.5 kV; desolvation gas (N₂) flow and temperature, 900 l/h and 450 °C; source temperature, 150

°C). The multiple reaction mode (MRM) was applied for MS/MS detection as detailed in **supplemental Table S-1**.

Data acquisition and analyses were performed with MassLynx[®] and TargetLynx[®] software, respectively (version 4.1, Waters). Compound concentrations were calculated using calibration curves plotted from standard solutions. Exogenous internal standards were used to normalize the detector response as follows: ¹⁵N₂-TRP for TRP, and 2-CAD for DA, QA, NE, 5-HT, KYN, NA, 5-HIAA, KA and XA.

Real-time quantitative RT-PCR

2 µg of purified RNA extracted from the hindbrain of embryos at E17 and from the brainstem stem of 7 months-old animals, was reverse transcribed using M-MLV Reversed Transcriptase (Promega) in a total volume of 25 µl. The resulting cDNA was diluted 40-fold in DNase and RNase-free water. Thereafter, 5 µl of each cDNA diluted sample was used as template for PCR amplification using SYBR Green (Qiagen, Courtaboeuf, France) as fluorogenic intercalating dye. The relative expression levels were calculated using the comparative 2^{-ΔΔCt} method (Livak & Schmittgen 2001) and β-2-microglobulin RNA as housekeeping gene. The primers used for the amplification were: Tryptophan hydroxylase 2 (TPH-2), forward: ATCCCAAGTTCGCTCAGTTTTCTC3, reverse: ACGCCCGCAGTTGACCTTC; indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), forward : ATGGCGTATGTGTGGAAC, reverse: TCGTAAGACAGAATGGG; kynurenine mono-oxygenase (KMO), forward: GCTTCCAACGCATAGTGATG, reverse: GGCAGGCAACAGAAAGAAATC3; β-2-microglobulin forward: GATGGCTCGCTCGGTGAC, β-2-microglobulin reverse CGTAGCAGTTGAGGAAGTTGG.

Statistical Analysis

Experimental results are expressed as mean ± SEM. Statistical differences between the groups were assessed by Mann-Whitney test. Statistical differences were considered significant when the p-value was less than 0.05.

Results

Effect of protein-restriction on the concentrations of kynurenine pathway metabolites in maternal plasma.

Pregnant dams fed a low protein diet exhibited decreased circulating levels of tryptophan along with reduced plasma concentrations of all the examined kynurenine pathway metabolites but anthranilic acid (**Figure 2**). This effect was observed both at 13 and 17 days of gestation. Of note, though the circulating levels of tryptophan and kynurenine were essentially the same at 13 and 17 days of pregnancy, the concentration of the other KYN metabolites increased between these two stages in both control and PR dams (**Figure 2**).

Effect of maternal protein-restriction on Trp metabolism in placenta and the foetal brain.

Bonnin et al., have recently demonstrated that Trp is transformed to 5-HT in the placenta and that this biosynthetic pathway serves as unique source of 5-HT for the foetal forebrain from E10 to E15 (Bonnin *et al.* 2011). After this developmental stage, the major source of 5-HT to the embryonic forebrain is the one derived from the metabolism of Trp within the hindbrain serotonergic neurons. However, to the best of our knowledge, there are no data about the concentration of the different kynurenine pathway metabolites in the brain embryo at these early developmental stages. Therefore, and with the aim to dissociate the effects of undernutrition on Trp metabolism in the embryonic brain from those in the placenta, we analysed the effects of maternal protein-restriction on Trp metabolism at E13 and E17 in these two tissues.

In agreement with the observations in plasma, protein-restriction induced a significant decrease in the concentration of Trp in the placenta both at E13 and E17 that was correlated with a reduced concentration of 5-HT and 5-HIAA (**Table 1**). There was also a significant reduction in the concentration of Trp, serotonin and 5-HIAA in both the hindbrain and forebrain of malnourished embryos at E13. In contrast, we found no differences in brain tryptophan levels between control and protein-restricted embryos at E17 (**Table 1**). Surprisingly, however, the concentration of serotonin was reduced as well as that of 5-HIAA though this latter metabolite was decreased in the forebrain but not in the hindbrain. Consequently, at E17 the 5-HIAA to 5-HT ratio increased in the hindbrain and decreased in the forebrain of malnourished embryos (**Table 1**), indicating that protein-restriction induces

regional, and opposite, effects on serotonin turnover in the foetal brain at this developmental stage. Maternal malnutrition enhanced also placental serotonin turnover at both developmental stages as indicated by the increased 5-HIAA/5-HT ratio in the placentas from protein-restricted mothers (**Table 1**).

Concerning the kynurenine pathway, the concentrations of KYN, KA, QA and anthranilic acid (AA) were reduced in the placenta at E17 but not at E13 (**Table 2**). In contrast, there were no major differences at E13 and E17 in the effects induced by protein-malnutrition in the brain. At these two developmental stages we observed that, although the concentration of KYN was not affected by protein restriction, PR embryos exhibited a significant reduction in the concentration levels of kynurenic acid and anthranilic acid without any change in the levels of xanthurenic acid. Of note, however, the concentration of quinolinic acid was increased by 54% in forebrain of PR embryos at E17. As a consequence, the QA/KA and XA/KA ratios were increased (**Table 2**). Conversely, the KA/KYN and the KA/QA ratios were decreased. An enhanced QA to KA ratio is associated with ischaemic damage whereas the KA/KYN and the KA/QA ratios are reduced in patients with major depressive disorder (Myint *et al.* 2007, Savitz *et al.* 2015).

Effect of maternal protein-restriction on TrP metabolism in the adult brain.

In agreement with previous studies, we observed a significant increase in the concentration of serotonin in the brain stem, hippocampus and cortex of adult rats born to protein-restricted dams (**Figure 3A**). These changes were paralleled by enhanced levels of tryptophan in the brain stem and cortex as well as by decreased cortical serotonin turnover (5-HIAA/5-HT controls = 1.31 ± 0.14 vs 5-HIAA/5-HT PR = 0.87 ± 0.02 ; $p < 0.01$).

Malnutrition in early life induced also long-term changes in the kynurenine pathway of tryptophan as indicated by the increased concentration of kynurenine in the brain stem and cortex of the adult offspring born to PR dams (**Figure 3B**). Adult PR rats exhibited also enhanced brain concentrations of kynurenic acid and xanthurenic acid as compared with their control counterparts, but these changes were not homogeneous among the different brain regions. Thus, the concentration of kynurenic acid was significantly enhanced in the hippocampus but not in the brain stem or in cortex. Indeed, xanthurenic acid was the only

metabolite of the kynurenine pathway whose concentration was increased in all examined brain regions (**Figure 3B**).

Effect of maternal protein-restriction on dopamine and noradrenaline.

The placental concentrations of both dopamine and noradrenaline were significantly reduced by maternal protein-restriction (DA control = 4281 ± 220 ng/g tissue vs DA protein-restricted 2229 ± 186 ng/g tissue $p < 0.01$; NE control = 955 ± 116 ng/g tissue vs NE protein-restricted = 624 ± 42 ng/g tissue, $p < 0.05$). Nevertheless, we found no differences between control and PR animals in the brain levels of these neurotransmitters neither in embryos nor in adult animals with the exception of a reduced concentration of NE in the forebrain of protein-restricted versus control embryos (control = 1301 ± 21 ng/g tissue vs protein-restricted 1070 ± 55 , $p < 0.05$).

Effect of perinatal malnutrition on the expression levels of TPH2, IDO and KMO

The first step in serotonin and kynurenine synthesis from tryptophan in the brain is catalyzed, respectively, by the enzymes tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). KYN is further converted through the action of kynurenine 3-monooxygenase (KMO) to 3-hydroxy kynurenine. This latter compound, serves as precursor for the synthesis of xanthurenic acid, quinolinic acid and NAD (**Figure 1**). To determine whether the effects of protein-restriction could be explained by an altered expression of TPH2 and/or KMO, we measured by real-time PCR the relative transcription levels of the mRNAs encoding for these genes in embryonic hindbrain and adult brainstem. As illustrated in **Figure 4A**, maternal protein-restriction induced a significant reduction of KMO expression in the embryonic brain without affecting TPH2 or IDO gene expression. In contrast, adult malnourished animals exhibited a significant reduction of TPH2 gene expression along with enhanced KMO mRNA levels (**Figure 4B**).

Discussion

The herein presented results show that maternal protein-restriction in the rat induces selective changes in kynurenine pathway metabolism in the embryonic brain which are opposite to those exhibited by adult offspring born to protein-restricted dams. In particular, whereas maternal protein-restriction had no effect on the concentration of kynurenine and xanthurenic

acid in the embryo, the concentration of these metabolites was increased by 75% and 46%, respectively, in the brain of adult PR rats. Moreover, protein-restricted embryos exhibited reduced levels of kynurenic acid both in hindbrain and forebrain. In contrast, the concentration of this metabolite was increased 4.7-fold in the hippocampus, but not in the brain stem or cortex, of PR adult rats.

The metabolism of tryptophan through the kynurenine pathway is initiated by the oxidative cleavage of the indole-ring of TrP by IDO. This reaction, which is the rate limiting step of the kynurenine pathway, results in the formation of N-formylkynurenine followed by kynurenine in an ensuing step. The subsequent metabolism of Kyn occurs via one of three mechanisms: (1) its deamination by the kynurenine amino-transferase (KAT) family of enzymes leads to the production of KA; (2) its degradation by kynureninase results in the production of anthranilic acid; (3) its hydroxylation by KMO produces 3-hydroxykynurenine (3-HK) which serves as an intermediate for the production of xanthurenic acid, quinolenic acid, nicotinic acid and, ultimately NAD (Fatokun *et al.* 2013). Real-time PCR experiments in the embryonic hindbrain and in the brain stem at adulthood showed that control and PR animals exhibited identical expression levels of IDO. In contrast, KMO gene expression was decreased and increased, respectively, in the embryonic and adult brain of PR rats. An increased expression of KMO should shunt KYN metabolism towards enhanced XA, QA and AA production and, therefore, induce a collateral reduction of KA. Conversely, a reduction of KMO expression should result in enhanced levels of KA and a decreased concentration of XA, AA and QA. The reduced expression of KMO in malnourished embryos was associated with decreased hindbrain and forebrain concentration of KA and AA whereas the concentration of XA and QA did not differ between control and PR embryos. In contrast, maternal protein-restriction induced paralleled effects on brain KMO expression and XA and AA levels in the brains stem at adulthood. However, PR affected nor the concentration of KA neither that of QA. This observation indicates that the altered metabolism of kynurenine induced by maternal protein-restriction cannot be fully explained by a modification within the brain of the mRNA levels encoding IDO or KMO, the key enzymes regulating the kynurenine pathway.

On the other hand, in contrast to serotonin, which does not cross the brain-blood barrier, kynurenine is transported into the brain from the circulation by the brain capillary large neutral amino acid carrier (Fukui *et al.* 1991, Speciale 1989). It has also been shown that the placenta has the capacity to metabolise tryptophan through the kynurenine pathway

(Manuelpillai *et al.* 2005, Sano *et al.* 2016). We found no differences between control and PR animals in the placental concentrations of KYN and kynurenine metabolites at E13 with the exception of a 59% increase in the concentration of XA in placenta from PR dams as compared with the levels in control tissue. However, the concentration of this metabolite was the same in the brain of control and PR embryos. In contrast, the concentration of KA and AA was decreased while that of QA was increased in the forebrain of E13 malnourished embryos. Similarly, at gestational day 17, protein-restricted dams exhibited decreased plasma and placental levels of KYN and of all kynurenine pathway metabolites. Yet, the levels of KYN, XA and QA in the hindbrain and forebrain of PR embryos were the same as in control embryos. These results show that, though protein-restriction altered the concentrations of KYN and its metabolites in maternal blood and placenta, neither the transfer of KYN metabolites from the maternal circulation to the foetus nor their placental release into the foetal circulation are associated with the observed changes in kynurenine pathway metabolism in the embryonic brain. A similar conclusion was reached by Sano *et al.*, who observed that protein-restriction does not alter the transfer of stable isotope-labelled tryptophan from the mother to the foetus (Sano *et al.* 2016). Further studies are therefore required to determine the mechanisms underlying the altered metabolism of KYN in the offspring of protein-restricted dams.

Several studies have documented that a modification of the cerebral concentration of the metabolites of the kynurenine pathway leads to impaired brain function and is associated with neurological and psychiatric disorders. In particular, enhanced brain levels of kynurenine and kynurenic acid have been reported in schizophrenic patients (Erhardt *et al.* 2001, Schwarcz *et al.* 2001). There is also a large body of evidence showing that early malnourished individuals are at high risk of developing schizophrenia (Hoek *et al.* 1998, Xu *et al.* 2009, Brown & Susser 2008). However, the actual mechanisms responsible for the increased brain levels of KYN and KA in schizophrenic patients remain unknown. We also ignore how and through which mechanisms prenatal nutrient restriction enhances the susceptibility to develop this mental disorder. In this respect, the herein presented results showing increased brain levels of KYN and KA in adult rats born to protein-restricted dams, suggest that altered kynurenine pathway metabolism might be a key link between perinatal malnutrition and the development of schizophrenia later in life.

Altered kynurenine pathway metabolism might also contribute to the cognitive deficits generally observed in early malnourished individuals. Actually, experimental studies in rodents have shown that increasing the concentration of KA in brain results in impaired spatial and working memory (Chess *et al.* 2007) and that the levels of this metabolite are enhanced by the exposure to chronic social defeat stress (Fuertig *et al.* 2015). Interestingly, adults rats treated for a short period of time during their firsts days of postnatal life or during adolescence with kynurenine (Trecartin & Bucci 2011, Iaccarino *et al.* 2013), or kynurenic acid (Akagbosu *et al.* 2012, DeAngeli *et al.* 2015), exhibit reduced social behaviour and impaired memory. Adult offspring of dams fed an enriched kynurenine diet from the last third of gestation to the end of lactation exhibit similar cognitive deficits (Pocivavsek *et al.* 2012). All together, these observations reveal that a transient alteration of the kynurenine pathway during early life has enduring effects on brain function.

It has been known for long time that Kynurenic acid is an antagonist of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR), as well as of all glutamate ionotropic receptors whereas QA acts as selective NMDA receptor agonist (Stone 1993, Hilmas *et al.* 2001, Schwarcz & Pellicciari 2002, Maddison & Giorgini 2015a). More recently, XA has been show to stimulate metabotropic glutamate (mGlu)2/3 receptors (Fazio *et al.* 2015). Therefore, the neurological effects of the kynurenine pathway metabolites are mainly due to the modulation of glutamate signalling and are the result of a subtle equilibrium between their stimulatory and inhibitory effects on glutamate receptors. This equilibrium is of particular concern for the structural organisation of the brain because of the key role of glutamate receptors in axon formation and maturation of synaptic contacts during *in utero* and neonatal development. Indeed, NMDA receptor blockade in neonatal rats has been reported to increase neuronal apoptosis, reduce volume and neuronal number within the hippocampus and alter hippocampal NMDA receptor expression (Ikonomidou *et al.* 1999, Harris 2003). Moreover, it has been documented that excessive activation of NMDA receptors results in a massive influx of Ca^{2+} into the cell followed by the translocation of pro-apoptotic genes to the mitochondria, activation of caspases and free radical formation leading to loss of nerve cells (Dong *et al.* 2009). Here we observed a more than a two-fold increase in the ratio of QUIN to KA in the brain of protein-restricted embryos, which is indicative of an overstimulation of NMDA receptors. This observation suggests that the alterations of the kynurenine pathway induced by maternal protein-restriction might contribute to the long-lasting brain structural abnormalities exhibited

by the offspring of malnourished dams comprising decreased number of neurons, spines, synapses, and dendritic arborisations in the hippocampal formation (Díaz-Cintra et al. 1991, Granados-Rojas et al. 2002).

Concerning the impact of maternal malnutrition on the metabolism of tryptophan via the serotonin pathway, there was a significant reduction in the concentration of serotonin in the placenta along with decreased levels of 5-HT in the hindbrain and forebrain of PR embryos. These changes were observed at both 13 and 17 days of gestation. Interestingly, however, protein-restriction induced effects of different magnitude on 5-HT turnover in hindbrain and forebrain at E17. Actually, whereas E13 malnourished embryos exhibited an almost identical reduction of 5-HT levels in hindbrain (-61%) and forebrain (-58%), in E17 PR embryos the concentration of 5-HT was reduced by 47% in hindbrain and by 18% in forebrain. In addition, while at E13 malnourished embryos exhibited an increased 5-HIAA/5-HT ratio in both brain regions, at E17 the 5-HIAA/5-HT ratio remained increased in hindbrain but was reduced in forebrain. A decreased 5-HIAA to 5-HT ratio is indicative of reduced serotonin release and, consequently, of decreased 5-HT activity.

Brain serotonin synthesis takes place exclusively in a group of neurons located along the midline of the brain stem from which they send ascending projections to the entire brain. In rodents, these neurons start to develop at E12 and acquire the capacity to synthesize 5-HT about one day later (Lidov & Molliver 1982, Aitken & Törk 1988, Lauder 1990). However, it is not until E17-E19 that 5-HT axons innervate all areas of the brain (Lidov & Molliver 1982, Aitken & Törk 1988). Before this developmental stage, placental serotonin acts as unique source of 5-HT to the foetal forebrain (Bonnin et al. 2011). Consequently, the reduced levels of 5-HT in the forebrain of malnourished embryos at E13 are likely due to the impaired synthesis of 5-HT in the placenta while the neurochemical alterations observed at E17 result from the effects of protein-restriction on 5-HT neurons themselves. Collectively, our results therefore show that maternal protein-restriction impairs placental 5-HT synthesis, affecting negatively serotonin levels in the early developing forebrain, and induces regional differences in serotonin neurotransmission within the foetal brain with enhanced serotonin activity in hindbrain and reduced serotonin turnover in forebrain. These regional differences might explain why only minimal brain structural defects are observed in early malnourished animals in spite of the well documented stimulatory role of serotonin on cell proliferation and differentiation and axon guidance. Indeed, the barrel field (BF) area of the somatosensory

cortex in rodents is transiently and densely innervated by serotonergic neurons during the early period of postnatal development. Yet maternal protein or calorie restriction induce marginal defects on barrel formation as compared to the significant reduction of BF areas produced by the administration of 5-HT depleting drugs (Persico *et al.* 2000, Gutiérrez-Ospina *et al.* 2002).

Our results about the effects of protein-restriction on serotonin, are in line with the data of Ramanamurthy (Ramanamurthy 1977) and Persico *et al.*, (Persico *et al.* 2000) who have also observed lower levels of 5-HT in the brain of neonatal rats born to PR dams as compared with control pups. Nevertheless, our observations are at odds with the results of other studies showing that Trp and serotonin levels are increased in the brain of embryos and pups of malnourished dams (Miller *et al.* 1977, Minkowski A 1981, Hernández *et al.* 1989). These conflicting results might be accounted for by methodological differences such as the use of global calorie restriction or ligation of the uterine artery as nutritional insult and the quantification of 5-HT in a pool of whole brain from different embryos as opposite to protein malnutrition and the determination of serotonin in separate brain regions of a single embryo as reported here.

Strikingly, as for some metabolites of the kynurenine pathway, adult PR rats exhibit increased brain levels of Trp and serotonin. Circulating tryptophan is predominantly bound to albumin such that, under normal physiological conditions, it is only about 10% of Trp which is present in free form in blood and, therefore, available for transport into the brain (McMenamy & Oncley 1958, Tagliamonte *et al.* 1973). Previous studies have shown that the free fraction of Trp in plasma is increased in pups nursed by dams fed a protein-restricted diet (Miller *et al.* 1977), as well as in low birth-weight infants (Manjarrez *et al.* 1998, Hernández *et al.* 1989), due to the low levels of blood albumin resulting from malnutrition. This would lead to an increased transport of Trp into the brain and, consequently, to enhanced cerebral 5-HT synthesis. This mechanism has been proposed to explain the increased levels of serotonin in the brain of malnourished neonatal rats (Miller *et al.* 1977, Manjarrez *et al.* 1998), but cannot account for the differences between the control and PR adult animals reported here since it is very unlikely that the levels of albumin in blood remain below normal values after six months of nutritional rehabilitation. Instead, the differences in the brain levels of Trp and 5-HT between control and PR adult rats could be associated to the metabolic perturbations induced by perinatal protein-restriction. Actually, it is well established that early malnourished

individuals are also at high risk of developing obesity, hyperlipidemia, hypertension and other physiological alterations characterizing the metabolic syndrome (Desai *et al.* 2015). Experimental studies in rodents have further shown that many of these features, including high plasma levels of nonesterified fatty acids (NEFAs), are also present in adult offspring born to protein-restricted dams (Orozco-Sólis *et al.* 2009, Ozanne SE 1998). Since NEFAs compete with Trp for the same albumin-binding sites, any increase in the circulating levels of these compounds would result, in theory, in an increased amount of free tryptophan available for transport into the brain. Further studies are nevertheless necessary to confirm this hypothesis.

In conclusion, the herein presented results show for the first time that maternal protein-restriction induces selective and long-lasting changes in the kynurenine pathway metabolism in the brain of the offspring. Given the key regulatory function of KYN and kynurenine-derived metabolites on neuronal development and brain physiology, these changes might play a role in the cognitive deficits and the enhanced susceptibility to develop psychiatric disorders, such as depression and schizophrenia, exhibited by individuals who were exposed to malnutrition early in life.

Acknowledgements :

We thank Ms Blandine Castellano and Mr Guillaume Poupeau for valuable assistance in husbandry; Dr Pierre De Coppet for helpful support with qPCR. PHMM and ASO were recipients of a doctoral fellowship from the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The present study was partially supported by CAPES-COFECUB (Action Number Me 657/09).

Competing interests:

The authors have no competing interests to declare.

References

- Aitken, A. R. and Törk, I. (1988) Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, **274**, 32-47.

- Akagbosu, C. O., Evans, G. C., Gulick, D., Suckow, R. F. and Bucci, D. J. (2012) Exposure to Kynurenic Acid During Adolescence Produces Memory Deficits in Adulthood. *Schizophrenia Bulletin*, **38**, 769-778.
- Albert, P. R., Vahid-Ansari, F. and Luckhart, C. (2014) Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **8**.
- Almeida, S. S., Tonkiss, J. and Galler, J. R. (1996) Malnutrition and Reactivity to Drugs Acting in the Central Nervous System. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **20**, 389-402.
- Baou, M., Boumba, V. A., Petrikis, P., Rallis, G., Vougiouklakis, T. and Mavreas, V. (2016) A review of genetic alterations in the serotonin pathway and their correlation with psychotic diseases and response to atypical antipsychotics. Vol. 170, pp. 18-29.
- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S. and Levitt, P. (2011) A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*, **472**, 347-350.
- Bonnin, A. and Levitt, P. (2011) Fetal, Maternal and Placental Sources of Serotonin and New Implications for Developmental Programming of the Brain. *Neuroscience*, **197**, 1-7.
- Brown, A. S., Os, J. v., Driessens, C., Hoek, H. W. and Susser, E. S. (2000) Further Evidence of Relation Between Prenatal Famine and Major Affective Disorder. *American Journal of Psychiatry*, **157**, 190-195.
- Brown, A. S. and Susser, E. S. (2008) Prenatal Nutritional Deficiency and Risk of Adult Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, **34**, 1054-1063.
- Carlsson, A. and Carlsson, M. L. (2006) A dopaminergic deficit hypothesis of schizophrenia: the path to discovery. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **8**, 137-142.
- Chess, A. C., Simoni, M. K., Alling, T. E. and Bucci, D. J. (2007) Elevations of Endogenous Kynurenic Acid Produce Spatial Working Memory Deficits. *Schizophrenia Bulletin*, **33**, 797-804.
- Costello, E., Worthman, C., Erkanli, A. and Angold, A. (2007) Prediction from low birth weight to female adolescent depression: A test of competing hypotheses. *Archives of General Psychiatry*, **64**, 338-344.
- DeAngeli, N., Todd, T., Chang, S., Yeh, H., Yeh, P. and Bucci, D. J. (2015) Exposure to Kynurenic Acid during Adolescence Increases Sign-tracking and Impairs Long-term Potentiation in Adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **8**.
- Desai, M., Jellyman, J. K. and Ross, M. G. (2015) Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes*, **39**, 633-641.
- Diáz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T. and Morgane, P. J. (1991) Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *The Journal of Comparative Neurology*, **310**, 356-364.
- Dong, X.-x., Wang, Y. and Qin, Z.-h. (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, **30**, 379-387.
- Erhardt, S., Blennow, K., Nordin, C., Skogh, E., Lindström, L. H. and Engberg, G. r. (2001) Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters*, **313**, 96-98.
- Fatokun, A. A., Hunt, N. H. and Ball, H. J. (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease. *Amino Acids*, **45**, 1319-1329.

- Fazio, F., Lionetto, L., Curto, M. et al. (2015) Xanthurenic Acid Activates mGlu2/3 Metabotropic Glutamate Receptors and is a Potential Trait Marker for Schizophrenia. *Scientific Reports*, **5**, 17799.
- Fuertig, R., Azzinnari, D., Bergamini, G. et al. (2015) Mouse chronic social stress increases blood and brain kynurenine pathway activity and fear behaviour: Both effects are reversed by inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. Vol. 54, pp. 59-72.
- Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L. and Almeida, S. S. (2002) Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behavioural Brain Research*, **133**, 271-277.
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y. and Smith, Q. R. (1991) Blood-Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism. Vol. 56, pp. 2007-2017. Blackwell Publishing Ltd.
- Gál, E. M. and Sherman, A. D. (1980) l-Kynurenine Its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochemical Research*, **5**, 223-239.
- Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L. (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 1002-1012.
- Granados-Rojas, L., Larriva-Sahd, J., Cintra, L., Gutiérrez-Ospina, G., Rondán, A. and Díaz-Cintra, S. a. (2002) Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescences asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Research*, **933**, 164-171.
- Gutiérrez-Ospina, G., Manjarrez-Gutiérrez, G., González, C., López, S., Herrera, R. o., Medina Aguirre, I. and Hernández-R, J. (2002) Neither increased nor decreased availability of cortical serotonin (5HT) disturbs barrel field formation in isocaloric undernourished rat pups. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **20**, 497-501.
- Hamon, M. and Blier, P. (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. Vol. 45, pp. 54-63.
- Harris, L., Sharp, T., Gartlon, J., Jones, D.N., Harrison, P.J. (2003) Long-term behavioural, molecular and morphological effects of neonatal NMDA receptor antagonism. *European Journal of Neuroscience*, **18**, 1706-1710.
- Hernández, J. R., Manjarréz, G. G. and Chagoya, G. (1989) Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasmal-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Research*, **488**, 1-13.
- Hilmas, C., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R. and Albuquerque, E. X. (2001) The Brain Metabolite Kynurenic Acid Inhibits $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Activity and Increases Non- $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Expression: Physiopathological Implications. *The Journal of Neuroscience*, **21**, 7463-7473.
- Hoek, W. H., Brown, S. A. and Susser, E. (1998) The Dutch Famine and schizophrenia spectrum disorders. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, **33**, 373-379.
- Iaccarino, H. F., Suckow, R. F., Xie, S. and Bucci, D. J. (2013) The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. In: *Special Section: Negative Symptoms*, Vol. 150, pp. 392-397.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M. et al. (1999) Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Science*, **283**, 70-74.
- Laino, C. H., Cordoba, N. E. and Orsingher, O. A. (1993) Perinatally protein-deprived rats and reactivity to anxiolytic drugs in the plus-maze test: An animal model for screening antipanic agents? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **46**, 89-94.
- Lauder, J. M. (1990) Ontogeny of the Serotonergic System in the Rat: Serotonin as a Developmental Signala. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **600**, 297-313.

- Lechin, F. and van der Dijs, B. (2005) Noradrenergic hypothesis of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **29**, 777-778.
- Leklem, J. E. (1971) Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **24**, 659-672.
- Levay, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J. and Kent, S. (2008) Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behavioural Brain Research*, **191**, 164-172.
- Lidov, H. G. W. and Molliver, M. E. (1982) Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Research Bulletin*, **9**, 559-604.
- Liliana, D. O., Claudia, C., Federico, M. and Donatella, M. Depression, Serotonin and Tryptophan. *Current Pharmaceutical Design*, **22**, 949-954.
- Lin, H., Lei, Y., Zhang, B., Dai, Z. and Lu, X. (2015) Common variants of HTR1A and SLC6A4 confer the increasing risk of Schizophrenia susceptibility: A population-based association and epistasis analysis. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, **168**, 749-755.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Maddison, D. C. and Giorgini, F. (2015a) The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **40**, 134-141.
- Maddison, D. C. and Giorgini, F. (2015b) The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. In: *Extracellular vesicles: a paradigm shift in how we think about cell-cell communication & Molecular neuroprotection*, Vol. 40, pp. 134-141.
- Manjarrez, G., Contreras, J., Chagoya, G. and Hernández-R, J. (1998) Free tryptophan as an indicator of brain serotonin synthesis in infants. *Pediatric Neurology*, **18**, 57-62.
- Manuelpillai, U., Ligam, P., Smythe, G., Wallace, E. M., Hirst, J. and Walker, D. W. (2005) Identification of kynurenine pathway enzyme mRNAs and metabolites in human placenta: Up-regulation by inflammatory stimuli and with clinical infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **192**, 280-288.
- McMenamy, R. H. and Oncley, J. L. (1958) The Specific Binding of l-Tryptophan to Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, **233**, 1436-1447.
- Miller, M., Leahy, J. P., Stern, W. C., Morgane, P. J. and Resnick, O. (1977) Tryptophan availability: Relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. *Experimental Neurology*, **57**, 142-157.
- Minkowski A, C. C., Priam M, Flexor MA, Hamon M, Bourgoin S, Kordon C. (1981) Long lasting effects of intrauterine malnutrition on neurotransmitters metabolism in the brain of developing rats. *Prog Clin Biol Res.*, **77**, 643-660.
- Muller, C. L., Anacker, A. M. J. and Veenstra-VanderWeele, J. (2016) The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. In: *Animal Models of Neuropsychiatric Disease*, Vol. 321, pp. 24-41.
- Myint, A.-M. and Kim, Y.-K. (2014) Network beyond IDO in psychiatric disorders: Revisiting neurodegeneration hypothesis. Vol. 48, pp. 304-313.
- Myint, A.-M., Kim, Y. K., Verkerk, R., ScharpÃ©, S., Steinbusch, H. and Leonard, B. (2007) Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection. *Journal of Affective Disorders*, **98**, 143-151.
- Nascimento, E., Guzman-Quevedo, O., Delacourt, N., da Silva Aragão, R., Perez-Garcia, G., de Souza, S. L., Manhães-de-Castro, R., Bolaños-Jiménez, F. and Kaeffer, B. (2013) Long-Lasting Effect of Perinatal Exposure to L-tryptophan on Circadian Clock of

- Primary Cell Lines Established from Male Offspring Born from Mothers Fed on Dietary Protein Restriction. *PLoS ONE*, **8**, e56231.
- Olvera-Cortés, M. E., Gutiérrez-Guzmán, B. E., López-Loeza, E., Hernández-Pérez, J. J. and López-Vázquez, M. Á. (2013) Serotonergic modulation of hippocampal theta activity in relation to hippocampal information processing. *Experimental Brain Research*, **230**, 407-426.
- Orozco-Sólis, R., Lopes de Souza, S., Barbosa Matos, R. J., Grit, I., Le Bloch, J., Nguyen, P., Manhães de Castro, R. and Bolaños-Jiménez, F. (2009) Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiology & Behavior*, **96**, 481-492.
- Ozanne SE, W. C., Petry CJ, Smith JM, Hales CN. (1998) Ketosis resistance in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Metabolism*, **47**, 1450-1454.
- Persico, A. M., Altamura, C., Calia, E., Puglisi-Allegra, S., Ventura, R., Lucchese, F. and Keller, F. (2000) Serotonin Depletion and Barrel Cortex Development: Impact of Growth Impairment vs. Serotonin Effects on Thalamocortical Endings. *Cerebral Cortex*, **10**, 181-191.
- Pocivavsek, A., Wu, H.-Q., Elmer, G. I., Bruno, J. P. and Schwarcz, R. (2012) Pre- and postnatal exposure to kynurenine causes cognitive deficits in adulthood. *European Journal of Neuroscience*, **35**, 1605-1612.
- Ramanamurthy, P. S. V. (1977) Maternal and early postnatal malnutrition and transmitter amines in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, **28**, 253-254.
- Réus, G. Z., Jansen, K., Titus, S., Carvalho, A. F., Gabbay, V. and Quevedo, J. (2015) Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. Vol. 68, pp. 316-328.
- Sano, M., Ferchaud-Roucher, V., Kaeffer, B., Poupeau, G., Castellano, B. and Darmaun, D. (2016) Maternal and fetal tryptophan metabolism in gestating rats: effects of intrauterine growth restriction. *Amino Acids*, **48**, 281-290.
- Sathyasaikumar, K. V., Stachowski, E. K., Wonodi, I., Roberts, R. C., Rassoulpour, A., McMahon, R. P. and Schwarcz, R. (2011) Impaired Kynurenine Pathway Metabolism in The Prefrontal Cortex of Individuals With Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, **37**, 1147-1156.
- Savitz, J., Drevets, W. C., Wurfel, B. E., Ford, B. N., Bellgowan, P. S. F., Victor, T. A., Bodurka, J., Teague, T. K. and Dantzer, R. (2015) Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. Vol. 46, pp. 55-59.
- Schwarcz, R. and Pellicciari, R. (2002) Manipulation of Brain Kynurenines: Glial Targets, Neuronal Effects, and Clinical Opportunities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **303**, 1-10.
- Schwarcz, R., Rassoulpour, A., Wu, H.-Q., Medoff, D., Tamminga, C. A. and Roberts, R. C. (2001) Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **50**, 521-530.
- Speciale, C., Hares, K., Schwarcz, R., Brookes N. (1989) High-affinity uptake of L-kynurenine by a Na⁺-independent transporter of neutral amino acids in astrocytes. *J Neurosci.* , **9**, 2066-2072.
- Stern, W. C., Miller, M., Forbes, W. B., Morgane, P. J. and Resnick, O. (1975) Ontogeny of the levels of biogenic amines in various parts of the brain and in peripheral tissues in normal and protein malnourished rats. *Experimental Neurology*, **49**, 314-326.

- Stiedl, O., Pappa, E., Konradsson-Geuken, Å. s. and Å–gren, S. O. (2015) The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, **6**.
- Stone, T. W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacological Reviews*, **45**, 309-379.
- Tagliamonte, A., Biggio, G., Vargiu, L. and Gessa, G. L. (1973) Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sciences*, **12**, 277-287.
- Tonkiss, J. and Galler, J. R. (1990) Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behavioural Brain Research*, **40**, 95-107.
- Trecartin, K. V. and Bucci, D. J. (2011) Administration of kynurenine during adolescence, but not during adulthood, impairs social behavior in rats. *Schizophrenia Research*, **133**, 156-158.
- Trzcińska, M., Tonkiss, J. and Galler, J. R. (1999) Influence of Prenatal Protein Malnutrition on Behavioral Reactivity to Stress in Adult Rats. *Stress*, **3**, 71-83.
- Xu, M.-Q., Sun, W.-S., Liu, B.-X. et al. (2009) Prenatal Malnutrition and Adult Schizophrenia: Further Evidence From the 1959-1961 Chinese Famine. *Schizophrenia Bulletin*, **35**, 568-576.
- Yang, C. J., Tan, H. P. and Du, Y. J. (2014) The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development. Vol. 267, pp. 1-10.
- Zheng, X., Kang, A., Dai, C., Liang, Y., Xie, T., Xie, L., Peng, Y., Wang, G. and Hao, H. (2012) Quantitative Analysis of Neurochemical Panel in Rat Brain and Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **84**, 10044-10051.

Table 1. Effects of maternal protein-restriction on tryptophan metabolism through the serotonin pathway in the embryo.

	Placenta		Hindbrain		Forebrain	
	C	PR	C	PR	C	PR
ED13						
Trp	10865 ± 743	8057 ± 290**	8952 ± 347	7681 ± 135**	8397 ± 291	7458 ± 265*
5-HT	403 ± 22	261 ± 13**	110 ± 3.96	43.19 ± 2.37**	97.80 ± 2.16	40.96 ± 1.64**
5-HIAA	30.10 ± 3.10	18.69 ± 0.47**	223 ± 13	168 ± 10*	222 ± 12	140 ± 9**
5-HIAA/5-HT	14.17 ± 1.07	26.42 ± 0.85**	2.01 ± 0.08	3.97 ± 0.31**	2.27 ± 0.11	3.47 ± 0.28**
ED17						
Trp	14085 ± 417	10926 ± 286**	8912 ± 671	7961 ± 260	10439 ± 628	10570 ± 826
5-HT	377 ± 51	197 ± 12**	369 ± 12	197 ± 6.27**	267 ± 16	218 ± 8.58*
5-HIAA	42.20 ± 4.45	22.22 ± 2.44**	428 ± 26	380 ± 30	287 ± 16	140 ± 6**
5-HIAA/5-HT	10.50 ± 1.30	21.81 ± 2.59*	1.16 ± 0.04	1.92 ± 0.12**	1.09 ± 0.06	0.65 ± 0.06**

The concentrations of Trp, 5-HT and 5-HIAA are expressed in ng/g of tissue. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$ compared with the determination in the same tissue in control animals.

Table 2. Effects of maternal protein-restriction on tryptophan metabolism through the kynurenine pathway in the embryo

	Placenta		Hindbrain		Forebrain	
	C	PR	C	PR	C	PR
Embryonic Day 13						
KYN	7296 ± 737	6833 ± 599	18902 ± 1176	17356 ± 686	17606 ± 919	16305 ± 1095
KA	254 ± 39	199 ± 27	85 ± 7.69	34 ± 2.52**	87 ± 3.30	37 ± 3.72**
AA	3619 ± 246	4049 ± 147	68 ± 6.47	61 ± 5.81	81 ± 4.82	63 ± 2.75*
XA	1871 ± 193	2976 ± 182**	123 ± 3.84	121 ± 4.01	130 ± 8.21	123 ± 8.78
QA	2583 ± 180	2062 ± 70	3412 ± 366	3284 ± 217	2163 ± 124	3340 ± 245*
QA/KA ratio	10.79 ± 0.87	10.19 ± 1.69	41 ± 5.16	98 ± 7.44**	25 ± 1.62	80 ± 5.07**
KA/KYN ratio x100	2.36 ± 0.26	3.51 ± 0.53	0.46 ± 0.05	0.20 ± 0.01**	0.50 ± 0.02	0.24 ± 0.02**
KA/QA ratio x100	7.45 ± 1.01	9.76 ± 1.20	2.72 ± 0.38	1.06 ± 0.09 **	4.11 ± 0.26	1.15 ± 0.13**
Embryonic Day 17						
KYN	9336 ± 580	5500 ± 886 **	8390 ± 1088	7478 ± 716	10938 ± 853	9187 ± 1239
KA	1574 ± 385	560 ± 164*	210 ± 17.31	87 ± 8.09**	164 ± 12.72	50 ± 4.43**
AA	5414 ± 263	2558 ± 219**	65 ± 4.48	29 ± 2.21*	60 ± 5.13	44 ± 2.02*
XA	3486 ± 164	3293 ± 238	123 ± 9.53	130 ± 8.58	140 ± 7.07	137 ± 13.78
QA	3966 ± 408	2500 ± 227**	2280 ± 173	2210 ± 154	2466 ± 289	2508 ± 266
QA/KA ratio	2.95 ± 0.31	3.91 ± 1.06	11.40 ± 1.39	23.91 ± 2.12**	15.50 ± 2.26	51.38 ± 12.04**
KA/KYN ratio x100	7.78 ± 2.62	9.80 ± 2.55	2.67 ± 0.27	1.26 ± 0.19**	1.52 ± 0.08	0.56 ± 0.03**
KA/QA ratio x100	36.14 ± 4.46	28.20 ± 6.94	9.46 ± 0.96	4.38 ± 0.38**	7.82 ± 0.65	2.07 ± 0.21**

The concentrations of the metabolites are expressed in ng/g of tissue. p* < 0.05; p** < 0.01 compared with the determination in the same tissue in control animals.

Figure legends

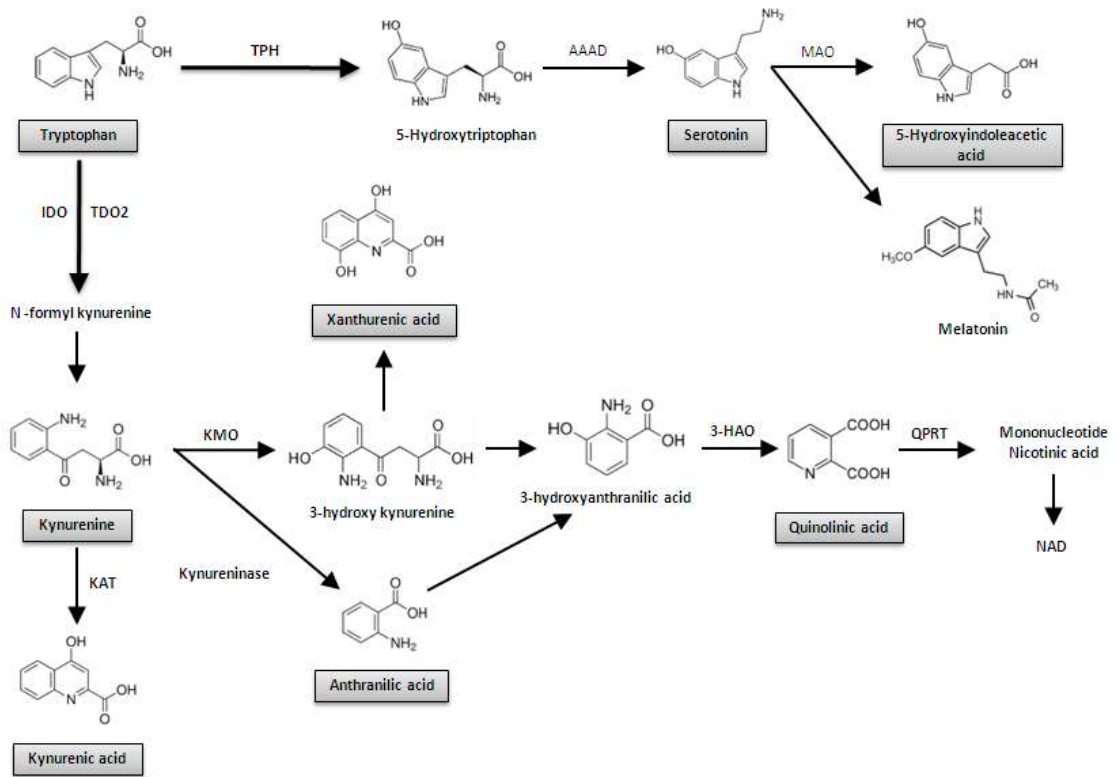
Figure 1 Schematic illustration of tryptophan metabolism through the serotonin and kynurenine pathways. The metabolites quantified in the present study are presented in shady boxes. TPH = Tryptophan hydroxylase; AAAD = Aromatic L-amino acid decarboxylase; MAO = Monoamine oxidase; IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO = Tryptophan 2,3-dioxygenase; KAT = Kynurenine amino transferase; KMO = kynurenine 3-monooxygenase; 3-HAO = 3- Hydroxyanthranilic acid oxygenase; Quinolinic acid phosphoribosyltransferase.

Figure 2 Concentration of kynurenine pathway metabolites in plasma from control and protein-restricted pregnant rats at gestational day 13 (A) and gestational day 17 (B). $p^* < 0.05$; $**p < 0.01$ compared with the concentration in plasma from control animals.

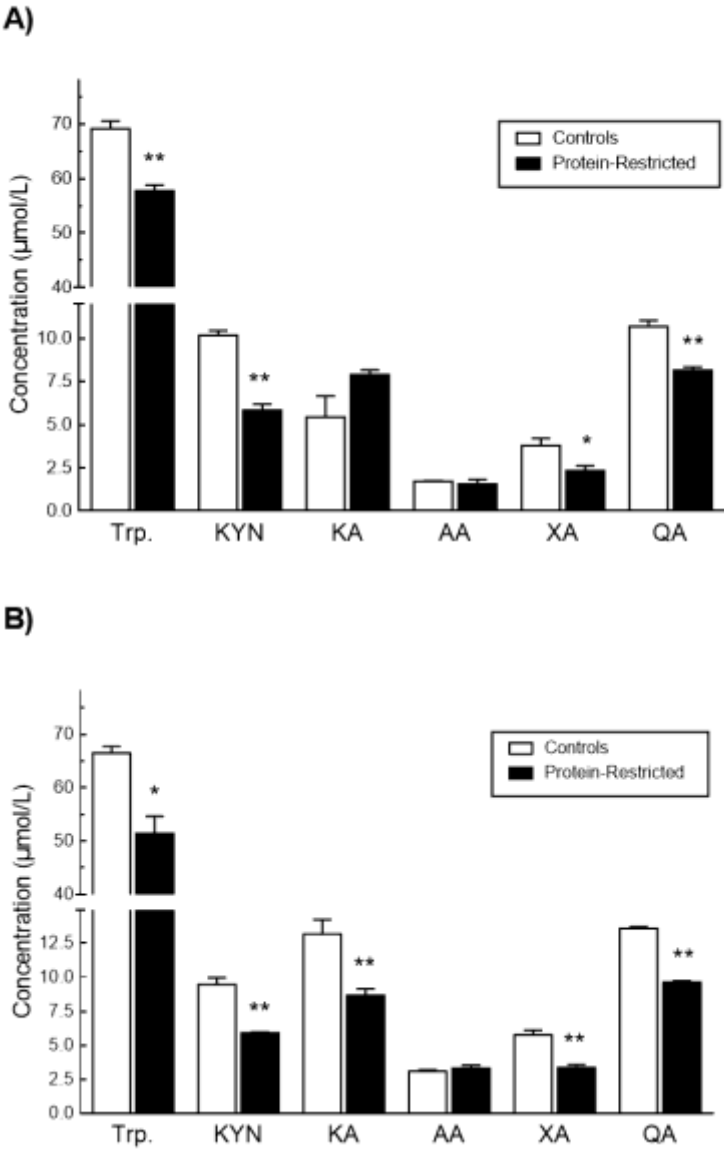
Figure 3 Impact of maternal protein-restriction on tryptophan metabolism through the serotonin (A) and kynurenine (B) pathways in the brain of the offspring at adulthood. The concentration of the different metabolites was determined by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry using brain samples from 7-month-old rats born to control or protein-restricted dams and fed standard chow since weaning. $p^* < 0.05$; $**p < 0.01$ compared with the concentration in control animals.

Figure 4 Impact of maternal protein-restriction on the expression levels in the embryonic (A) and adult brain (B) of the genes encoding for key enzymes of tryptophan metabolism through the serotonin (TPH2) and kynurenine (IDO, KMO), pathways. Fold changes in gene expression were calculated by dividing the $2^{-\Delta Ct}$ value of each sample by the averaged $2^{-\Delta Ct}$ of the respective control group. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$ compared with control animals.

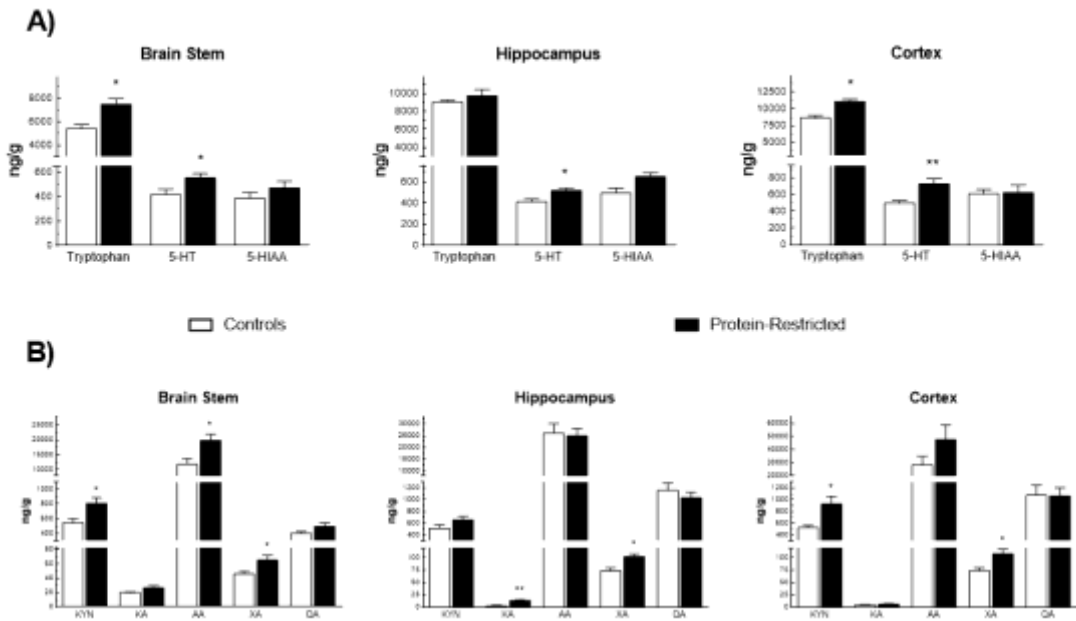
Honorio de Melo Martimiano et al., Figure 1

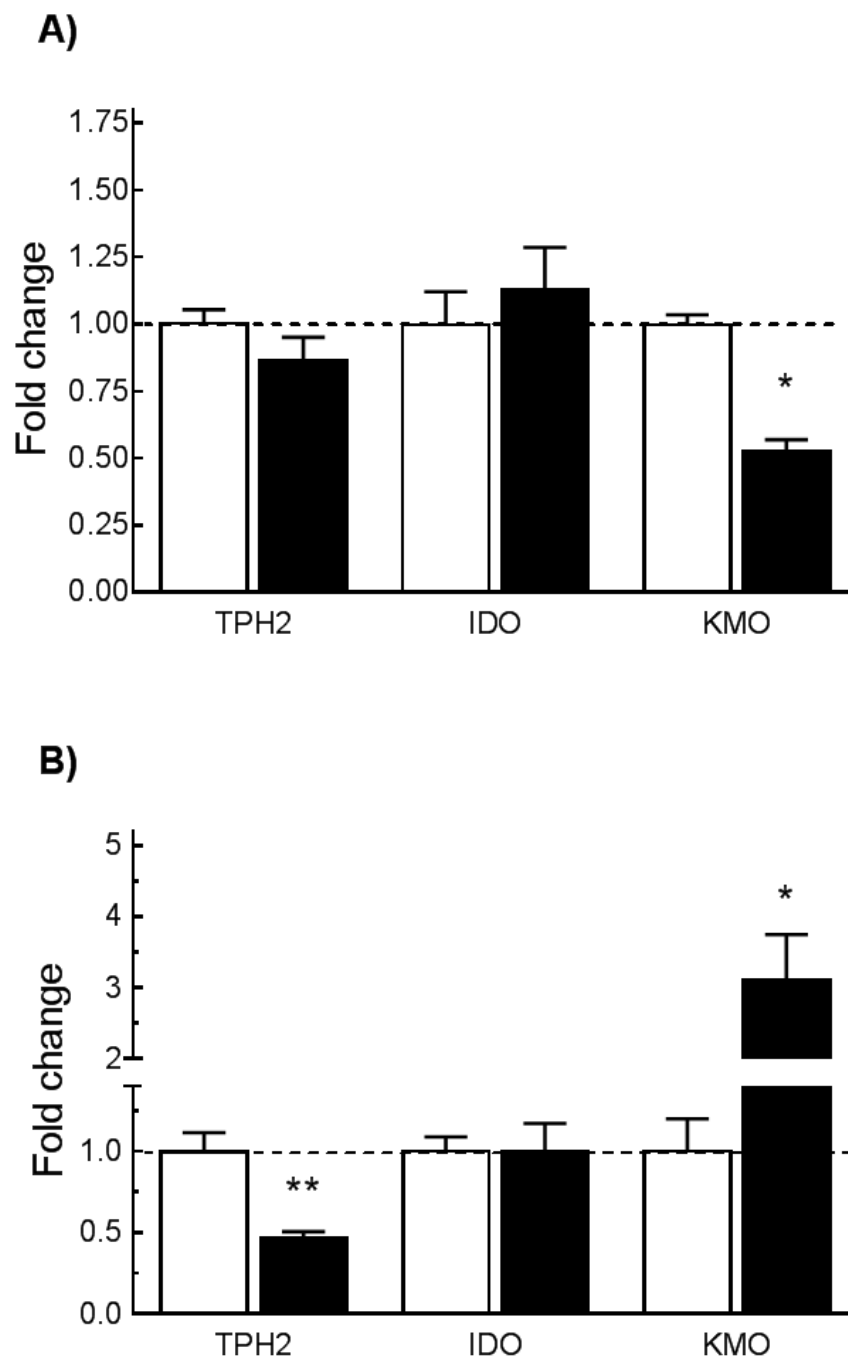


De Melo Martimiano et al., Figure 2



De Melo Martimiano et al., Figure 3



De Melo Martimiano et al., Figure 4

Supplemental material

Supplemental Table S-1. MRM parameters used for mass spectrometry detection and concentrations of standards.

Compounds	Calibration range	MRM transitions (m/z)	Cone/Collision (V)
NA	0.5 – 5.0 μ M	123.8 > 77.7	38/18
QA	1.0 – 10.0 μ M	167.9 > 150.0	20/8
5-HT	1.0 – 10.0 μ M	177.0 > 160.1	18/8
KA	0.2 – 2.0 μ M	189.9 > 144.0	30/18
5-HIAA	0.5 – 5.0 μ M	192.0 > 146.1	26/14
TRP	10.0 – 100.0 μ M	205.0 > 188.0	14/8
XA	0.2 – 2.0 μ M	206.0 > 160.0	30/18
¹⁵ N ₂ -TRP	50 μ M (fixed)	207.0 > 189.1	20/8
KYN	1.0 – 10.0 μ M	209.0 > 192.0	20/8
CA	200 μ M (fixed)	180.9 > 163.0	16/10
2-CAD	5 μ M (fixed)	302.0 > 170.1	30/20
DA	1.0 – 10.0 μ M	153.9 > 137.1	18/10
NE	1.0 – 10.0 μ M	170.0 > 152.0	12/6
NAD	20.0 – 180.0 μ M	664.0 > 524.0	30/19

5.2 Résultats supplémentaires

Effet de la malnutrition protéique périnatale sur les voies métaboliques du tryptophane cérébral des animaux de la deuxième génération à l'âge adulte

Il n'y a pas eu de différence significative dans les niveaux de Trp, 5-HT, 5-HIAA, KYN, Ka et Qa dans le cortex (figure 9a et 9c) ni dans l'hippocampe (figure 9b et 9d) entre les animaux contrôles et les dénutris de deuxième génération.

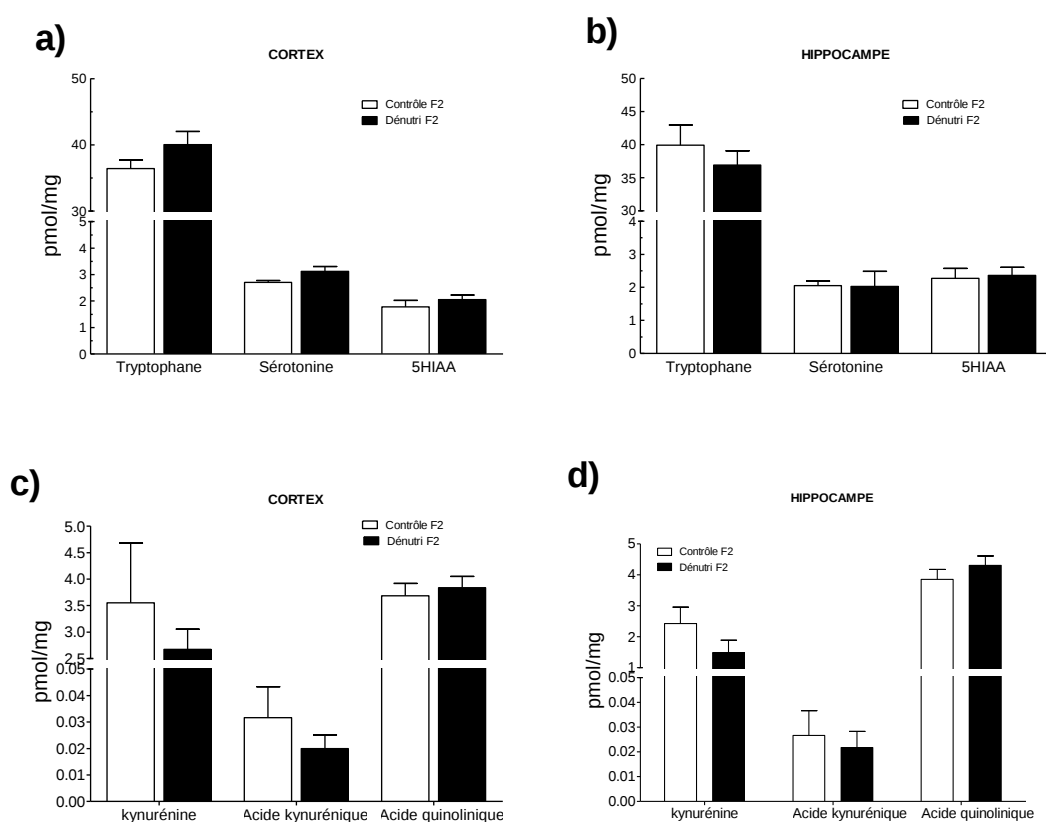


Figure 9. Analyse quantitative de la voie métabolique de la sérotonine à partir du tryptophane dans le cortex (a), l'hippocampe (b), et la voie métabolique de la kynurénine à partir du tryptophane dans le cortex (c) et l'hippocampe (d) des animaux de deuxième génération. Les données ont été analysées par le test *t-student*.

Effet de la malnutrition protéique périnatale sur le gain du poids des animaux de la première et deuxième génération au cours de la lactation et après sevrage.

Les animaux dénutris de la génération F1 ont présenté une augmentation de gain de poids comparés au groupe contrôle durant les 9 premiers jours de lactation (contrôle, 200.20 ± 4.99 , $n=48$ versus dénutri 168.32 ± 6.43 , $n=47$) (figure 10a). Après sevrage, les animaux dénutris de première génération F1 ont présenté une augmentation de gain de poids comparés au groupe contrôle dans les deux premiers mois de vie (contrôle, 550.25 ± 9.91 , $n=23$ versus dénutri 645.75 ± 35.52 , $n=11$) (figure 10b). Les animaux dénutris de la génération F2 ont présenté une augmentation de gain de poids comparés au groupe contrôle durant les 9 premiers jours de lactation (contrôle, 190.70 ± 6.89 , $n=48$ versus dénutri 228.66 ± 7.46 , $n=48$) (figure 10c). Après sevrage, les animaux dénutris de la génération F2 ont présenté une augmentation de gain de poids comparés au groupe contrôle entre 60 et 100 jours de vie (contrôle, 62.68 ± 1.830 , $n=25$ versus dénutri 72.75 ± 3.230 , $n=17$) (figure 10d).

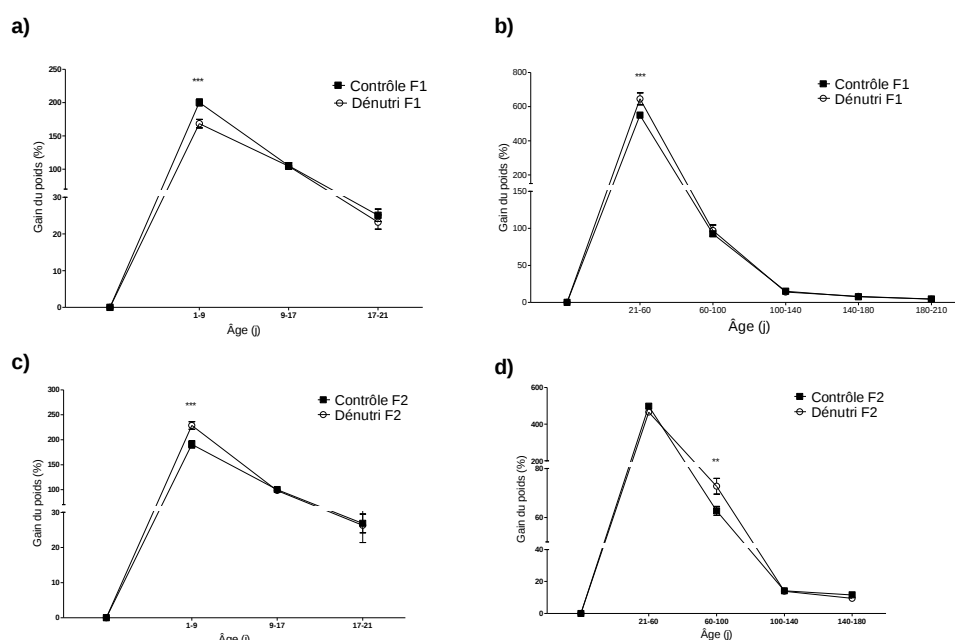


Figure 10. Gain de poids des animaux de première génération au cours de la lactation et après sevrage (b). Gain de poids des animaux de deuxième génération au cours de la lactation (c) et après sevrage (d). Les données ont été analysées par two-way ANOVA suivi du test de Bonferroni. Moyenne $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$.

Effet de la malnutrition protéique périnatale sur la consommation de nourriture hypercalorique et poids du tissu adipeux des animaux de la deuxième génération à l'âge adulte

Il n'y a pas eu de différence significative dans la consommation alimentaire entre les animaux contrôles et les dénutris de deuxième génération exposés à la diète hypercalorique durant 10

jours consécutifs d'observation de jour (figure 11a) et de nuit (figure 11b). Le poids du tissu adipeux des animaux de deuxième génération F2 exposés à la diète hypercalorique a été plus grand comparé au contrôle (contrôle, $28,05 \pm 3,06$, $n=6$ versus dénutri $31,56 \pm 0,93$, $n=5$) (figure 11c).

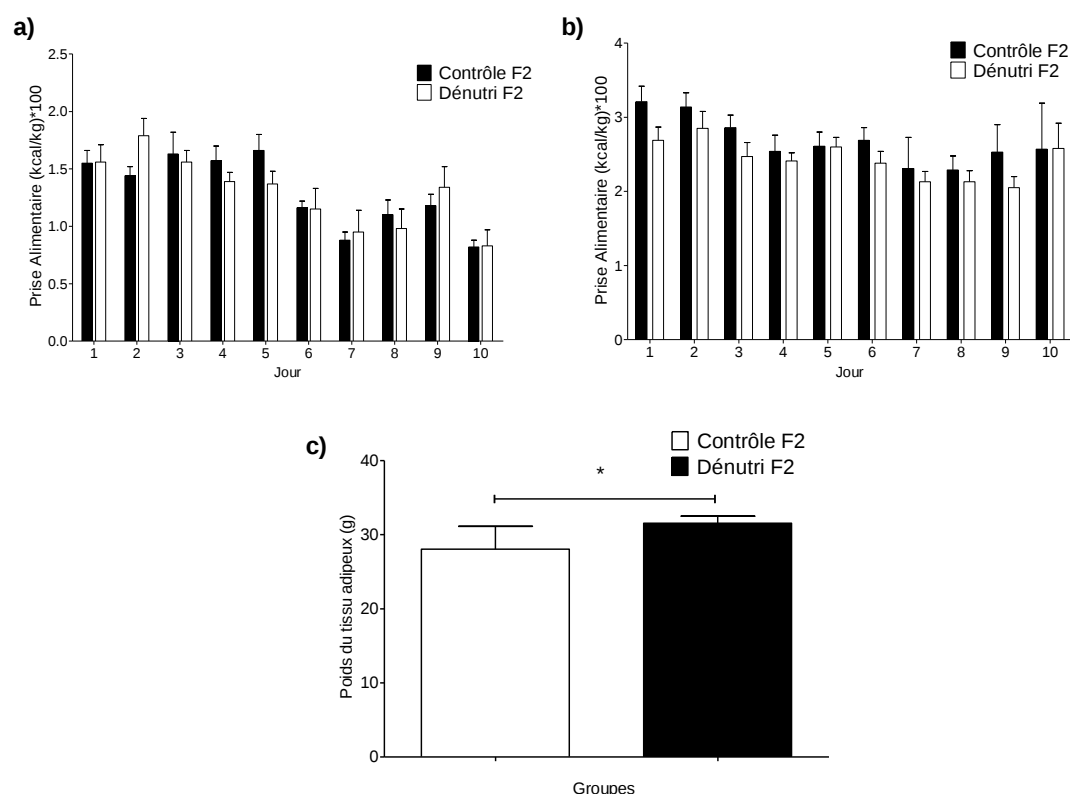


Figure 11. Consommation d'aliment hypercalorique d'animaux de deuxième génération durant 10 jours consécutifs d'observation de jour (a) et de nuit (b). Les données sont exprimées en (Kcal/kg de poids)x100. Poids du tissu adipeux en gramme (c). Moyenne $\pm$ SEM. Les données ont été analysées par two-way ANOVA suivi du test de Bonferroni. Groupe contrôle, $n=6$ et groupe dénutri, $n=5$.

Effet de la malnutrition protéique périnatale sur le poids corporel et profil métabolique des animaux de première et deuxième génération à l'âge adulte

Les animaux dénutris de première génération F1 ont présenté un moindre poids corporel comparés au groupe contrôle (contrôle, 664.40 ± 15.59 , $n=14$ versus dénutri 586.7 ± 53.13 , $n=11$) (figure 11a). Les animaux dénutris de première génération F1 ont présenté une moindre quantité de tissu adipeux comparés au groupe contrôle (contrôle, $31,96 \pm 1,989$, $n=15$ versus dénutri $24,69 \pm 2,135$, $n=11$) (figure 11b). Il n'y a pas eu de différence statistique dans le test de tolérance au glucose entre les animaux de première génération F1

(figure 12c). Il n'y a pas eu de différence statistique dans le poids corporel entre les animaux contrôle et les dénutris de deuxième génération F2 (figure 11d). Les animaux dénutris de deuxième génération F2 ont présenté une plus grande quantité de tissu adipeux comparés au groupe contrôle (contrôle, $20,97 \pm 0,92$, $n=12$ versus dénutri $29,59 \pm 2,40$, $n=12$) (figure 12e). Il n'y a pas eu de différence statistique dans le test de tolérance au glucose entre les animaux de deuxième génération F2 (figure 11f).

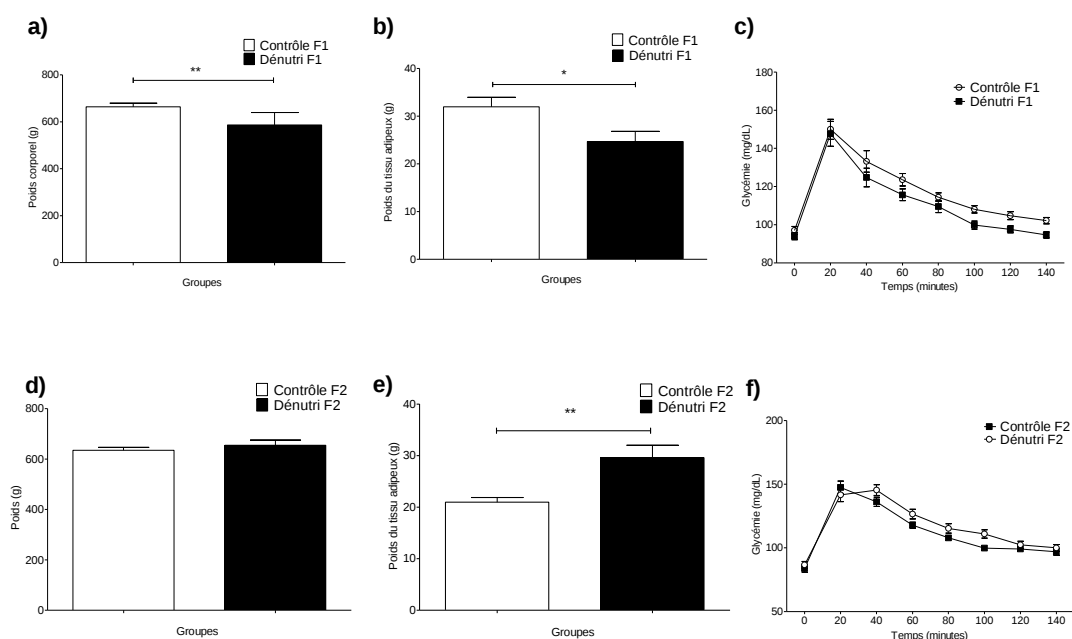


Figure 12. Poids absolu en grammes des animaux de première génération F1 (a). Poids du tissu adipeux des animaux de première génération F1 (b). (c) Test de tolérance au glucose des animaux de première génération F1. Poids absolu en grammes des animaux de deuxième génération F2 (d). Poids du tissu adipeux des animaux de deuxième génération F2 (e). Test de tolérance au glucose des animaux de deuxième génération F2 (f). Les données ont été analysées par *two-way ANOVA* suivi du test de *Bonferroni* pour le test de tolérance au glucose et pour le test *t-student* pour l'évaluation du poids corporel et du tissu adipeux. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$. * $P < 0,05$.

Discussion générale

6 Discussion générale

La présente étude a analysé l'impact à court et à long terme de la dénutrition périnatale sur le métabolisme du Trp cérébral. Au niveau expérimental, la dénutrition est en général induite par l'offre de diètes réduisant la concentration de nutriments spécifiques, comme par exemple de basses concentrations de protéine ou la réduction de la quantité d'aliment offert caractérisé comme restriction calorique. La manipulation de la protéine bénéficie d'une grande attention en raison de son importance plastique dans la croissance et le développement et parce qu'elle est un nutriment d'accès difficile en raison de son coût.

Le premier article de cette thèse a eu pour objectif de quantifier les produits du métabolisme du Trp et l'expression des enzymes TPH2, IDO et KMO dans des cerveaux d'embryons et de rats adultes soumis à la dénutrition protéique périnatale. Le second bloc de résultats, considérés comme partiels, a abordé les altérations qui peuvent être transmises aux animaux de deuxième génération.

La dénutrition protéique périnatale a altéré le métabolisme du Trp dans la phase embryonnaire du développement cérébral, on le constate par la réduction dans la concentration de Trp, de 5-HT et de 5-HIAA dans le *forebrain* et le *hindbrain* des embryons analysés. On présente quelques hypothèses pour expliquer ces résultats. L'on sait qu'à 13 jours de vie intra-utérine, l'unique voie de synthèse de 5-HT pour le *forebrain* fœtal se trouve au niveau placentaire à partir du Trp maternel. Dans notre étude l'on a constaté que les niveaux plasmatiques de Trp maternel se trouvent réduits chez les rats qui ont été exposés à une diète pauvre en protéine. Fernstrom JD. (1979) a observé que des diètes contenant 18 à 24% de caséine interfèrent dans les niveaux plasmatiques de Trp. Ce fait peut avoir contribué à la réduction des niveaux de 5-HT et de son métabolite 5-HIAA dans les embryons (Fernstrom, 1979).

Dans le *hindbrain* à 13 jours de vie intra-utérine la synthèse de 5-HT semble ne pas dépendre du Trp maternel, car dans cette structure la 5-HT peut être synthétisée par l'embryon lui-même. Ce fait peut avoir contribué à la réduction des niveaux de Trp, 5-HTP et de 5-HIAA dans les embryons G13 dans le *hindbrain*, car malgré l'absence de contribution maternelle comme source de 5-HT pour l'embryon, on doit prendre en considération l'influence de la diète pauvre en protéine sur l'embryon en tant que tel. Le manque de

protéine peut perturber le transport de Trp au niveau cérébral, de même que la synthèse de 5-HT et par conséquent de 5-HIAA. Le Trp est transporté par un transporteur localisé dans les capillaires de la barrière hémato-encéphalique. Ce transporteur est partagé avec les aminoacides neutres comme la leucine, la valine, l'isoleucine, les trois aminoacides de la chaîne ramifiée (BCAA), la tyrosine, la phénylalanine et la méthionine. Par conséquent, l'entrée du Trp dans le cerveau est influencée par la relation entre le Trp et les aminoacides qui partagent le même transporteur, lesquels peuvent éventuellement être altérés chez les animaux utilisés dans l'expérience (Pardridge, 1998).

A 17 jours de vie intra-utérine la dénutrition protéique maternelle n'a pas altéré les niveaux de Trp cérébral dans les embryons, mais a réduit la concentration de 5-HT dans le *forebrain* et le *hindbrain* de ces animaux. A ce moment la synthèse de 5-HT existe déjà dans tout le cerveau de l'embryon, car les axones sérotoninergiques sont déjà totalement implantés (Lidov and Molliver, 1982; Aitken and Tork, 1988). Outre l'influence de la diète, d'autres facteurs peuvent être engagés dans les altérations des niveaux de 5-HT indépendamment de la quantité de Trp disponible. Le Trp se métabolise par d'autres voies, outre la voie sérotoninergique, comme par exemple la voie de la mélatonine et la voie de la Kyn, laquelle est responsable de près de 90% de son métabolisme. Une altération prolongée de ces autres voies peut avoir un impact important sur les niveaux disponibles de 5-HT. En outre, des études suggèrent que des modifications des niveaux de 5-HT peuvent être liées à des altérations de l'activité de l'enzyme responsable de sa synthèse (Roberts and Fitzpatrick, 2013).

Dans notre étude, la dénutrition protéique a réduit l'expression génique de l'enzyme TPH2 dans le cerveau de embryons de 17 jours. La déplétion de 5-HTP cérébral durant l'embryogenèse a été observée avec l'emploi de parachloro-phénylalanine (PCPA), un inhibiteur de l'enzyme TPH2 (Koe et al. 2002).

La grande valeur de nos découvertes est apparue à partir du moment où nous avons pris en considération l'importance du rôle de la 5-HT durant le processus de développement cérébral et la conséquence que peut provoquer la réduction de sa concentration dans le cerveau. Comme la 5-HT se trouve précocement plus présente dans la période de développement que les autres systèmes de neurotransmetteurs, et du fait que le taux d'utilisation de la 5-HT est plus élevé dans le cerveau des mammifères immatures que dans

quelque autre période (Hamon and Bourgoïn, 1979), il est établi que la 5-HT joue un rôle fondamental dans divers processus cellulaires durant la croissance et la maturation cérébrale (Whitaker-Azmitia, 2001). Comme les terminaisons sérotoninergiques sont développées dans une région cible, et que leurs récepteurs sont disponibles, la libération de 5-HT peut influencer la neurogenèse (Lauder and Krebs, 1976; Lauder and Krebs, 1978), la rémotion neuronale, le raffinement dendritique, la migration de cellules et la plasticité synaptique (Lauder, Wallace et al. 1981; Chubakov, Gromova et al. 1986; Lauder, 1990; Chubakov, Tsyganova et al. 1993). Dans la phase tardive du développement, la 5-HT influence la croissance dendritique. Elle altère la longueur totale des dendrites, la formation des épines dendritiques et les branches dans l'hippocampe et dans le cortex (Mazer, Muneyyirci et al. 1997; Faber and Haring, 1999).

On notera avec intérêt que dans notre étude les niveaux de la Kyn et l'expression génique de l'enzyme IDO se sont conservées dans les cerveaux des embryons de 13 et 17 jours de vie intra-utérine, montrant à l'évidence une sélectivité des effets de la dénutrition protéique périnatale sur la voie sérotoninergique. Des études actuelles analysent le rôle du métabolisme du Trp placentaire par la voie Kyn et suggèrent son importance dans l'entretien et la stabilisation de l'immunitolérance materno-fœtale, évitant ainsi le rejet du fœtus (Nishizawa et al. 2007; Sedlmayr et al. 2014). En relation avec les métabolites de la Kyn, la nutrition maternelle pauvre en protéine a réduit les niveaux de KA et augmenté le niveaux de QA dans le cerveau des embryons de 13 et 17 jours de vie intra-utérine. Le KA agit comme un antagoniste endogène des récepteurs $\alpha 7$ -Nach-R et des récepteurs NMDA, tandis que le QA agit comme agoniste des récepteurs NMDA (Maddison and Giorgini, 2015). Tout comme la 5-HT, ces récepteurs sont décisivement engagés dans la plasticité neurale durant l'embryogenèse (Fagiolini et al. 2003; Iwasato et al. 2000). Ils jouent un rôle fondamental dans la formation initiale et l'orientation des ramifications neuronales et dans l'établissement et la stabilisation des synapses (Colonnese et al. 2005; Ultanir et al. 2007).

Des études expérimentales suggèrent qu'en bloquant les récepteurs NMDA durant la période périnatale, on provoque une perte substantielle des synapses en comparaison avec les animaux contrôle (Forrest et al. 2013). En outre le blocage du récepteur de NMDA dans la période néonatale chez les rats augmente l'apoptose neuronale, réduit le nombre et le volume des neurones dans l'hippocampe et altère l'expression du récepteur de NMDA de

l'hippocampe (Ikonomidou et al. 1999; Harris et al. 2003). Khalil et al. (2014) ont observé que l'augmentation du niveau de KA produit des altérations accentuées dans la morphologie de l'hippocampe et dans la localisation de protéines immunocytochimiques chez des animaux ayant 60 jours de vie. D'un autre côté il a déjà été établi que l'activation excessive de ces récepteurs, causée par l'augmentation de QA et la réduction concomitante de KA aboutit à une excitotoxicité, à la formation de radicaux libres et à la perte de cellules nerveuses, caractéristiques compatibles avec des maladies neurodégénératives et psychiatriques (Sapko et al. 2006).

Dans notre étude a été constatée pour RT-PCR une réduction dans l'expression génique de l'enzyme KMO, ce qui ne justifie pas la réduction des niveaux de KA et l'augmentation de QA cérébral. Selon Zwillling et al. (2011), l'inhibition de l'enzyme KMO réduit les niveaux de QA et augmente indirectement les niveaux de KA, améliorant les processus neurodégénératifs. La vie métabolique de la Kyn dans le cerveau, est complexe, et pour cette raison semblent nécessaires des études qui fassent des recherches sur les autres aspects moléculaires de l'enzyme KMO et également de la KAT, enzyme qui convertit directement Kyn en KA, ce qui permet de trouver ainsi la justification de la réduction des niveaux de KA et l'augmentation de QA dans les organismes dénutris durant la période périnatale.

Devant ces résultats et ayant connaissance des fonctions des métabolites analysés dans la présente étude, l'on suggère qu'il existe une forte relation entre les altérations trouvées dans le métabolisme du Trp dans la phase embryonnaire et les altérations cérébrales présentes chez des animaux dénutris dans la vie adulte. Des études montrent que la diète hypoprotéique durant les périodes critiques du développement aboutit à la diminution de poids du cerveau des petits, particulièrement dans la période post-natale (de Souza, Fernandes et al.; Joshi, Shaikh et al. 2003; de Souza, Pacheco Lda et al. 2008). Ses effets délétères sont associés à une suite d'évènements qui s'étendent sur tout le développement du cerveau, y compris l'étape de la formation des cellules (neurogenèse et gliogenèse), la migration des cellules, et tous les aspects de la différenciation, comme la myélinisation et la synaptogenèse (Debassio, Kemper et al. 1994; Lukoyanov and Andrade, 2000). Il a déjà été établi que la dénutrition périnatale interfère dans le temps de développement du gyrus denté (Debassio, Kemper et al. 1994; Debassio, Kemper et al. 1996) et dans la morphologie des cellules de l'hippocampe (Diaz-

Cintra, Cintra et al. 1991). Elle affecte en outre la génération de cellules pyramidales (Cintra, Diaz-Cintra et al. 1990; Granados-Rojas, Serrano et al. 2002), elle induit une réduction dans la neurogenèse des cellules granuleuses (Debassio, Kemper et al. 1994; Debassio, Kemper et al. 1996) et elle altère le nombre d'interneurones GABA (Diaz-Cintra, Gonzalez-Maciel et al. 2007). Le processus de migration neuronale semble aussi être affecté, car des altérations dans la prolifération cellulaire peuvent modifier le temps où ces cellules arrivent à destination, sans recevoir correctement leurs stimulus, ce qui peut produire des altérations neurophysiologiques (Morgane, Mokler et al. 2002).

En parallèle aux résultats provenant des embryons, la présente étude a eu comme objectif d'analyser les métabolites du Trp dans les structures cérébrales d'animaux adultes. Curieusement l'on a observé des effets opposés. Leur répercussion à long terme a été mise en évidence par une augmentation de la concentration de Trp et de 5-HT dans le cortex et le tronc cérébral, de même que l'augmentation de 5-HT dans l'hippocampe d'animaux adultes soumis à dénutrition durant la période de gestation et de lactation. Resnick, Morgane PJ (1984) ont relevé des élévations dans les concentrations de Trp et de 5-HT dans des régions cérébrales analysées par spectrofluorimétrie, processus réalisé depuis la naissance jusqu'à 30 jours de vie chez des rats de mères alimentées avec 6% de caséine. On doit noter que ces élévations sont semblables à celles observées chez des rats soumis à la caséine à 8% (Miller et al. 1977). Chen et al., 1992, ont montré que chez des rats adultes, la dénutrition périnatale augmente la libération de 5-HT et de 5-HIAA dans l'hippocampe *in vitro*.

Pour justifier l'augmentation de ces métabolites au niveau cérébral, l'on a analysé l'expression de la TPH2, enzyme responsable de la synthèse de 5-HT à partir du Trp dans le cerveau. L'on a observé que la dénutrition protéique maternelle réduit les niveaux d'expression de la TPH2 dans le tronc cérébral d'animaux adultes, ce qui rend difficile de justifier nos découvertes à partir de ce résultat. Manjarrez-Gutierrez et al. (2012) ont suggéré que les rats dénutris durant la période périnatale présentaient une augmentation significative de la concentration de Trp et de 5-HT, une augmentation de l'activité de la TPH1, et une réduction de l'activité de la TPH2 dans le tronc cérébral en relation aux contrôles durant la lactation. Le nombre des neurones immunoréactifs qui exprime TPH1 chez les rats dénutris a été significativement plus important comparé au groupe contrôle. Le contraire a été observé dans les neurones qui expriment TPH2, ce qui a montré une diminution significative dans la

descendance dénutrie. Ces résultats sont intéressants parce qu'on a noté et reconnu que la TPH1 apparaît de préférence chez des rats adultes en différents organes périphériques en comparaison avec TPH2 que l'on croyait à l'origine être spécifique des neurones sérotoninergiques localisés dans le tronc cérébral. En outre, contrairement à des recherches récentes qui signalent l'apparition de la TPH1 à peine au 22^{ème} jour (Nakamura et al. 2006; Nakamura and Hasegawa, 2007), l'on a observé la présence de la TPH1 depuis la naissance. Ces résultats indiquent fortement la présence de la TPH1 et une activité possible dans le cerveau pré-natal avec un rôle important dans la synthèse de 5-HT durant les périodes précoces du développement. Cela suggère que la restriction protéique peut produire une altération de l'expression de la TPH1 dans le tronc cérébral durant le développement, ce qui contribue à l'augmentation des niveaux de 5-HT cérébrale observée chez ces animaux. Dans notre recherche, l'on n'a pas évalué le niveau d'expression de la TPH1, mais cet objectif fait partie de nos perspectives.

Les altérations de la voie métabolique de la 5-HT semblent en relation avec divers déficits cognitifs et métaboliques présentés par des animaux exposés à une dénutrition précoce. L'on sait que la 5-HT participe à diverses fonctions du corps, comme par exemple l'alimentation, l'émotion et la cognition. Les études montrent que les effets comportementaux de la 5-HT sont partagés par divers types de récepteurs. Le 5-HT_{1A} est l'un des mieux étudiés en raison de son implication dans les comportements liés à l'anxiété (Heisler et al. 1998; Parks et al. 1998; Toth, 2003), dans la dépression (Lucki, 1991), comme dans les processus cognitifs qui sont endommagés dans diverses perturbations psychiatriques (Millan et al. 2012). Son rôle potentiel comme drogue a fait également l'objet de recherches (Blier and Ward, 2003). Les récepteurs 5-HT₇ sont impliqués dans la dépression, l'anxiété, dans l'apprentissage et la mémoire (Leopoldo et al. 2011).

Des études expérimentales montrent que des rats dénutris durant la période de développement manifestent des altérations du comportement social (Almeida, Tonkiss et al. 1996) et exploratoire (Almeida, Tonkiss et al. 1996), outre des déficits liés à la mémoire (Castro and Rudy 1993; Cordoba, Arolfo et al. 1994). Fukuda et ses collaborateurs (Fukuda, Francolin-Silva et al. 2002) ont démontré que les animaux dénutris dans la période de lactation jusqu'à 49 jours après la naissance, ont eu des difficultés dans la consolidation des

informations spatiales (apprentissage spatial) acquises durant la phase d'entraînement d'un test appelé le Labyrinthe aquatique de Morris (en anglais : *Morris water maze*) (Redish and Touretzky 1998; de Hoz, Martin et al. 2004). Benton (Benton 2010) a observé qu'une déficience fœtale et néonatale de protéine et de fer entraîne des déficits de mémoire. De fait, des enfants exposés à la dénutrition dans la période périnatale manifestent des déficits cognitifs (Galler and Ramsey 1989; Walker, Grantham-Mcgregor et al. 2000), dans l'apprentissage et la mémoire (Tonkiss and Galler 1990; Fukuda, Francolin-Silva et al. 2002), ou bien ils manifestent aussi la capacité de développer des maladies psychiatriques comme la dépression (Brown et al. 2000; Costello, Worthman et al. 2007).

Des réponses à long terme ont été établies sur des animaux à 22 jours de vie, dont les mères avaient été exposées à une diète pauvre en protéines (caséine 6%) durant les périodes de gestation et de lactation. Ils ont présenté une augmentation dans la libération de 5-HT dans les tissus de l'hippocampe (Chen, Tonkiss et al. 1992; Chen, Yoshida et al. 1995) et une augmentation dans la réponse de la libération de 5-HT après stimulation électrique du noyau moyen de la raphe (Mokler, Bronzino et al. 1999). Il a été établi que l'administration de l'anxiolytique, chlorodiazépoxide benzo diazépine, à des animaux dénutris, réduit la libération de 5-HT dans l'hippocampe (Mokler, Galler et al. 2003). Les benzo diazépines sont connus pour réduire les niveaux extracellulaires de 5-HT chez des rats stressés, ce qui suggère que la réduction de la libération de 5-HT dans l'hippocampe chez des rats exposés à la dénutrition protéique pré-natale peut être associée à une augmentation de la réponse de l'animal au stress (Mokler, Galler et al. 2003). En parallèle, des rats dénutris durant la gestation présentent une augmentation des niveaux de 5-HT et de 5-HIAA quand ces animaux sont exposés à la séparation maternelle après la naissance, ce qui constitue un modèle de stress assez utilisé dans les recherches expérimentales (Kehoe et al. 2001).

Des études ont eu comme objectif de chercher les effets de la fluoxétine (inhibiteur de la réception de la sérotonine) sur l'agressivité de rats adultes exposés à la dénutrition durant la période de lactation. On a montré que la fluoxétine réduit l'agressivité chez les animaux contrôles, fait que l'on n'observe pas chez les animaux dénutris, ce qui suggère que le système sérotoninergique est affecté par la dénutrition durant les périodes critiques du développement (Barreto-Medeiros, Feitoza et al. 2004). La fluoxétine a aussi été utilisée pour

évaluer le comportement du système immunitaire des animaux exposés à la dénutrition durant la période de lactation. On a montré que la libération d'oxyde nitrique dans la présence de fluoxétine est réduite dans les macrophages alvéolaires d'animaux dénutris durant la période de développement (Ferreira, Galvao et al. 2009). On a également établi que des rats dénutris durant la période de gestation présentaient une altération dans le cycle sommeil-veille et ce fait a été associé aux altérations trouvées dans les niveaux de 5-HT cérébral. Les altérations du sommeil peuvent avoir un impact sur le comportement social et dans les fonctions cognitives de ces animaux (Datta and Hobson 2000).

En outre, il est déjà bien établi que la 5-HT inhibe l'ingestion des aliments par l'intermédiaire de son interaction avec les récepteurs localisés dans l'hypothalamus (Dalton et al. 2006). Ainsi on a suggéré que la restriction protéique durant le développement périnatal atténue l'action inhibitrice de la 5-HT sur l'ingestion d'aliments au moyen de la réduction de sensibilité du récepteur 5-HT_{1B}, et ces résultats sont conformes avec l'idée que les altérations adaptatives de la signalisation de la 5-HT se développent pour compenser les hauts niveaux cérébraux de 5-HT induits par la dénutrition précoce (Lopes de Souza et al. 2008). Ce fait, joint à la programmation des circuits hypothalamiques qui règlent l'homéostasie énergétique, est un pas fondamental dans le développement de l'hyperphagie et de l'obésité. (Desai et al. 2007; Orozco-Solís et al. 2010).

Un autre fait important à considérer est que dans la présente étude, la dénutrition protéique périnatale a augmenté la concentration de Kyn dans le cortex et le tronc cérébral des animaux analysés. Il y a très peu d'études qui abordent les altérations du métabolisme de la Kyn en raison de la dénutrition durant le développement fœtal. Jusqu'à présent, il n'y a eu qu'une seule étude ayant comme objectif de quantifier les concentrations des métabolites du Trp y compris KYN et QA dans le plasma et les tissus de fœtus et de mères exposées à la dénutrition protéique maternelle aux 13^{ème} et au 20^{ème} jours de vie intra-utérine (Sano, Ferchaud-Roucher et al. 2014). Ces auteurs ont observé que la concentration de QA a été deux fois plus forte chez les animaux dénutris au 20^{ème} jour, ce qui peut être neurotoxique pour le cerveau du rat.

Malgré le manque d'études qui mettent en relation la dénutrition périnatale avec les niveaux de Kyn et ses métabolites altérés, l'on peut faire un parallèle avec les diverses

conditions pathologiques qui sont liées à l'augmentation des niveaux de KYN, comme de ses intermédiaires. Il été observée en sérum, dans le liquide céphalorachidien (LCR) et dans le tissu cérébral de patients avec diverses maladies qui engagent le système nerveux central et qui entraînent une perturbation cognitive importante. Les pathologies associées à l'augmentation de la régulation de la voie de KYN incluent des maladies infectieuses (HIV), des maladies neurologiques (Alzheimer, Huntington, et sclérose latérale amyotrophique), des perturbations affectives (schizophrénie, dépression et anxiété) et des maladies auto-immunes (sclérose multiple et arthrite rhumatoïde). Toutes ces pathologies se caractérisent par la présentation, au cours de leur développement, de perturbations dans les processus cognitifs, tels que des altérations de la perception, de la mémoire, du raisonnement, de la pensée et du langage (Guillemin G, Brew, 2002; Guillemin, 2005; Bruijn Li et al. 2004; Beal, Matson et al. 1990; Zamanakou, Germanis et al. 2007).

Des études expérimentales ont montré que les rats avaient été traités avec 100 mg/kg de Kyn, ce qui provoque une augmentation de trois à quatre fois dans la concentration de KA (Erhardt et al. 2004), consistant dans l'augmentation observée chez des personnes atteintes de schizophrénie (Erhardt et al. 2001), ce qui entraîne des déficits dans le comportement social, dans la mémoire spatiale, et un déficit d'attention (Chess et al. 2007, 2009; Trecartin et Bucci, 2011). Nos données indiquent qu'un niveau élevé de la KYN n'a pas réussi à augmenter de façon significative les niveaux de KA. Aussi cette question devra-t-elle être abordée dans les études à venir.

Dans le niveau métabolique, les études montrent que des niveaux plastiques de KYN et l'expression d'IDO dans les tissus adipeux et dans le foie ont été plus élevés chez des femmes obèses que chez des femmes maigres (Wolowczuk, Hennart et al. 2012). KYN et les marqueurs inflammatoires, y compris la protéine C-réactive, se trouvent à des niveaux élevés chez les individus obèses morbides (Brandacher, Hoeller et al. 2007). La proportion Trp/KYN est significativement augmentée chez les patients obèses en comparaison avec le groupe contrôle et ne se normalise pas après réduction de poids.

A partir des altérations trouvées dans le métabolisme cérébral du Trp chez les animaux qui avaient été exposés à une diète pauvre en protéine durant la période de développement, a surgi l'intérêt de poursuivre la recherche et d'analyser si ces altérations pourraient être transmises à des animaux de deuxième génération. Actuellement un élément-clé de la

programmation est l'existence d'effets transgénérationnels, par quoi une exposition maternelle à divers facteurs en début de vie peut affecter la santé non seulement de la première génération, mais aussi celle des générations à venir. Un des facteurs qui pourraient expliquer les effets transgénérationnels serait l'héritage épigénétique. La nutrition par exemple peut induire en certains points des altérations épigénétiques qui peuvent être transmises aux autres générations, affectant ainsi la santé des descendants. Actuellement la réponse transgénérationnelle de la nutrition est considérée comme la principale influence sur la longévité.

Plusieurs études prospectives fournissent des preuves convaincantes que l'exposition maternelle peut avoir sur la santé de la descendance des effets permanents qui se perpétuent à travers les générations (Heijmans et al. 2008). Un bon exemple en serait la génération F2 des descendants de la famine hollandaise (1944): les bébés, dont les grand-mères maternelles avaient traversé une période de famine durant la grossesse, présentaient un indice pondéral plus important en comparaison des contrôles, fournissant la preuve d'un effet transgénérationnel (Painter, Osmond et al. 2008).

L'on sait que l'une et l'autre voie, la maternelle et la paternelle, jouent un rôle important dans la transmission transgénérationnelle de la programmation, mais un plus grand nombre d'études montrent les effets de programmation transgénérationnelle à travers la voie maternelle (Pinto and Shetty, 1995; Lam et al. 2000; Pinheiro et al. 2008; Frantz et al. 2011; Martin et al. 2011; Peixoto-Silva et al. 2011; Nascimento et al. 2012). Pour atteindre un tel objectif, l'on a accouplé des rats qui avaient été dénutris durant la période périnatale avec des rats contrôles de première génération F1.

A l'évidence, nos résultats ne soutiennent pas l'hypothèse présentée sur le transfert transgénérationnel des altérations du métabolisme du Trp trouvées dans la génération F1 (Figure 9). Mais on doit prendre en considération que nos résultats sont partiels et que d'autres voies métaboliques du Trp, y compris l'étude moléculaire des enzymes présentes, doivent être réalisées pour une conclusion plus consolidée sur ce sujet. Malgré cela, si l'on prend en considération l'effet transgénérationnel de la programmation métabolique déjà assurée dans la littérature, nous avons pensé à faire un parallèle des caractéristiques phénotypiques rencontrées entre les générations F1 et F2. Des résultats intéressants ont été découverts.

L'on a observé que la dénutrition périnatale offerte aux animaux de la génération F1 a augmenté le gain de poids (*catch-up*) durant les neuf premiers jours de lactation et dans les deux premiers mois de vie (Figure 10a et 10b). De façon curieuse, le même phénomène a été observé chez des animaux de la génération F2, mettant en évidence un effet transgénérationnel des caractéristiques phénotypiques de ces animaux (Figure 10 c et 10d). Nos résultats confirment également le gain de poids observé chez des animaux de première génération, établi par da Silva Aragão et al. (2014). Selon ces auteurs, ces animaux ont présenté un plus grand gain de poids durant les deux premiers mois de vie post-natale. Les études montrent que le *catch-up* peut être un point-clef pour la programmation de l'obésité dans la vie adulte (Bieswal, 2006). Il a déjà été établi qu'après une période de restriction de nutriments les êtres humains et d'autres espèces de mammifères présentent durant la phase de réhabilitation nutritionnelle un taux plus rapide de croissance que les autres individus maintenus dans une nutrition adéquate (MacLean and Graham, 1980). Ce phénomène de croissance compensatoire est associé à l'hyperphagie et correspond à un mécanisme de fonctionnement homéostatique pour accélérer la restauration du poids corporel. En outre il y a des évidences considérables que la croissance compensatoire mène à un remplacement des réserves de graisse plus rapide que la reconstitution de la masse corporelle maigre (Dulloo and Girardier, 1990).

A l'âge adulte, les animaux dénutris de la génération F1 ont présenté une réduction de la quantité de tissu adipeux absolu, accompagnée d'une réduction du poids corporel comparé au groupe contrôle (Figure 12 a et 12b). Nos résultats confirment les études antérieures qui n'avaient montré aucune altération ni réduction dans l'accumulation de graisse corporelle après la dénutrition protéique maternelle (Bieswal et al. 2006; Fagundes et al. 2007; Da Silva Aragão et al. 2014). En contrepartie, ces résultats diffèrent d'autres études où la dénutrition protéique périnatale prédispose au surgissement de dyslipidémies et d'excès de tissu adipeux (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009). Ces divergences peuvent s'expliquer par la différence de durée ou d'intensité de la restriction nutritionnelle, et aussi par les différentes méthodes utilisées pour estimer l'adiposité du corps. En outre, certaines études suggèrent que la quantité d'aliments consommés par la mère durant la période de gestation peut avoir un impact significatif sur le développement du tissu adipeux dans le fœtus (Parsons et al. 2001). En relation avec les animaux de deuxième génération, l'on a observé une plus grand quantité

de tissu adipeux chez les animaux dénutris, que ce soit sous régime alimentaire modèle, ou sous exposition à la diète hypercalorique (Figure 12e; Figure 11c). Pinheiros et al. (2008) ont observé une augmentation de tissu adipeux chez des animaux de deuxième génération descendants de ceux qui avaient été exposés à la diète pauvre en protéine durant la gestation et la lactation. Les auteurs attribuent ce résultat aux altérations trouvées dans les niveaux de leptine de ces animaux (Pinheiros et al. 2008). La leptine dérivée du tissu adipeux est fondamentale dans le contrôle central de l'appétit et de l'équilibre énergétique (Kershaw and Flier, 2004).

Plusieurs recherches indiquent encore que le *catch-up* est associé à la diminution de la dépense énergétique et que le dépôt de graisse corporelle est élevé, même en l'absence d'une ingestion accrue d'aliments (Ozelci et al. 1978; Dulloo et al. 1993; Crescenzo et al. 2003). Sur la base de cette observation et des résultats d'études antérieures montrant que la descendance de mères alimentées avec une diète pauvre en protéine durant le développement présente une hyperphagie et une préférence pour des aliments riches en sucre et en graisse, nous avons fait l'hypothèse que ces caractéristiques pourraient être transmises à la deuxième génération. Comme on l'a vu dans nos résultats, il n'a pas été possible de confirmer cette hypothèse, car il n'y a pas eu de différence significative dans la consommation de diète hypercalorique entre les animaux contrôles et les dénutris de deuxième génération durant 10 jours consécutifs d'observation (Figure 11a et 11b). Un fait à discuter est l'âge où ces animaux ont été analysés, car on observe que l'hyperphagie présentée par des animaux soumis à la dénutrition protéique dans la période périnatale apparaît durant les six premières semaines après le sevrage. Dans une étude réalisée par notre groupe de recherche, l'on a observé que des animaux exposés à une diète pauvre en protéine durant la période périnatale présentent une augmentation dans la consommation de la diète patron à 35 jours de vie, mais cette caractéristique disparaît à 180 jours (Orozco-Sólis et al. 2009). En outre, toujours à 180 jours, la quantité de nourriture riche en graisse ingérée par les animaux contrôles a été significativement plus grande que la quantité d'aliments consommés sous les mêmes conditions par les rats dénutris (Orozco-Sólis et al. 2009).

On a suggéré que les altérations dans le comportement alimentaire associé à la dénutrition périnatale chez des animaux jeunes peuvent être provoquées par une désorganisation anatomique des noyaux hypothalamiques qui règlent l'ingestion d'aliments

(Plagemann et al. 2000 ; Yura et al. 2005). Un autre mécanisme qui a été proposé dans la tentative de justifier l'hyperphagie induite par la programmation fœtale est une altération des niveaux d'expression de plusieurs neurotransmetteurs et peptides qui modulent l'alimentation, tels que le neuropeptide Y (Plagemann et al. 2000; Ikenasio- Thorpe et al. 2007), la colécystoquinine (Plagemann et al. 1999) et la protéine liée à l'agouti (Ikenasio-Thorpe et al. 2007). Mais des études sont nécessaires pour approfondir les connaissances touchant le comportement alimentaire de descendants de deuxième génération d'animaux qui ont été exposés à la dénutrition durant la période périnatale.

Dans le test de tolérance au glucose il n'y a pas eu de différence entre les animaux contrôles et les dénutris de la génération F1 (Figure 12 c). Nos résultats ont confirmé les études où ont été suggérées des valeurs normales de concentration de glucose ou d'hypoglycémie chez des animaux exposés à la dénutrition protéique périnatale comparés aux animaux contrôles (Fagundes et al. 2007; Silva Aragão et al. 2014). L'âge des animaux expérimentaux semble avoir une influence importante dans les résultats. Ozanne et ses collègues ont également observé que les petits de mères dénutries présentaient une meilleure réponse au glucose et une sensibilité à l'insuline seulement quand ils étaient petits (Ozanne et al. 1996). Dans notre recherche il n'y a pas eu de différence dans le test de tolérance au glucose entre les animaux contrôles et les dénutris de la génération F2 (Figure 12f). Pinheiros et al. (2008) ont observé que la restriction protéique maternelle chez les femelles F0 durant la gestation et la lactation a eu un effet hyperglycémiant sur les animaux des générations F1 et F2 (Pinheiros et al. 2008). Les résultats présentés par Pinheiros divergent de la présente étude, mais on doit considérer que la diète utilisée par Pinheiros et al. diffère de celle utilisée dans la présente étude, et qu'en outre la génération F1 présentait déjà un phénotype hyperglycémique, à la différence de la présente étude.

En conclusion les résultats de cette thèse suggèrent que la dénutrition périnatale induise des changements sélectifs dans le métabolisme cérébral du Trp qui persistent au long de la vie, mais ne sont pas transmises à la deuxième génération. En raison de la fonction-clé régulatrice de la 5-HT et des métabolites dérivés de la kynurénine sur le métabolisme énergétique et dans les processus liés à la cognition, on suggère que ces modifications puissent contribuer au développement d'altérations cognitives et métaboliques typiquement observées chez des individus qui ont été dénutris durant la période périnatale.

Perspectives

7 Perspectives

- Etudes de l'expression génique des enzymes TPH-1 et KAT dans le cerveau d'animaux dont les mères ont été dénutries durant la gestation et la lactation.
- Etudes des altérations épigénétiques induites par la dénutrition maternelle sur les enzymes TPH-2, IDO et KMO dans le cerveau d'animaux dénutris dans la période périnatale.
- Etude de l'expression génique et des altérations épigénétiques des enzymes liés au métabolisme de Trp dans le cerveau d'animaux de deuxième génération.
- Etudes comportementales, avec manipulation de métabolites du Trp, qui abordent des aspects cognitifs d'animaux de première et deuxième génération.

RESUMO DA TESE EM PORTUGUÊS

Apresentação

9.1 Apresentação

Já está largamente aceito que a restrição de um ou mais nutrientes durante o período fetal ou na infância é um estímulo para programar a suscetibilidade de inúmeras doenças crônicas na vida adulta. Tais doenças incluem as metabólicas como, obesidade, diabetes meliitus, doenças cardiovasculares e as patologias de ordem neurológica as quais levam a extenso prejuízo cognitivo. Essa teoria é sustentada por pesquisas experimentais as quais demonstram que a desnutrição durante a gestação e/ou lactação em animais pode produzir vários fenômenos observados em estudos epidemiológicos, como por exemplo, elevação da pressão arterial, intolerância a glicose, assim como déficit de memória e aprendizado em longo prazo.

Para explicar esta correlação, foi proposto que um organismo quando submetido a um ambiente pobre em nutrientes, durante períodos críticos do desenvolvimento, modifica o seu metabolismo para aumentar suas chances de sobrevivência. Desta forma, o organismo estaria “programado” para desenvolver-se em um ambiente constantemente pobre em nutrientes. Entretanto, se após este período, este organismo é exposto a um ambiente rico ou desequilibrado nutricionalmente, a incompatibilidade entre a sua “programação” fisiológica e as novas condições nutricionais torna este organismo mais susceptível ao aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta.

Atualmente, um elemento-chave da programação metabólica é a existência de efeitos transgeracionais, pela qual uma exposição a diversos fatores no início da vida pode afetar a saúde não só da primeira geração, mas também das gerações futuras. Vários estudos prospectivos fornecem evidências convincentes de que a exposição materna à fatores ambientais adversos, como a desnutrição, pode ter efeitos permanentes sobre a saúde da prole que se perpetuam através das gerações.

As evidências também sugerem que a desnutrição durante a gestação e/ou lactação, interfere de forma permanente na morfologia e fisiologia do cérebro na idade adulta, implicando na emergência das neuropatologias e nos distúrbios cognitivos associados a elas. A desnutrição materna é responsável por alterações estruturais no hipocampo e córtex cerebral, importantes regiões de aprendizagem e memória. Os estudos mostram que crianças

expostas à desnutrição durante períodos de alta susceptibilidade apresentam distúrbios cognitivos como déficit de aprendizagem.

Atualmente, os estudos tem se voltado para abordar os mecanismos pelos quais o ambiente precoce interfere nos aspectos celulares e fisiológicos do organismo. No entanto, todas as observações experimentais são mais descritivas do que mecanicistas na medida em que correspondem a alterações funcionais e estruturais associadas com a programação nutricional, mas não fornecem informações sobre a relação de causa-efeito entre a falta de um nutriente específico durante estágios críticos do desenvolvimento e a susceptibilidade de desenvolver doenças em fases posteriores da vida.

O triptofano é um aminoácido essencial adquirido unicamente através da dieta. Além de fazer parte estrutural das proteínas do corpo, seu metabolismo é responsável pela formação de serotonina, quinurenina e de uma série de metabólitos intermediários neuroativos como ácido quinurênico e ácido xantorênico, nos quais suas funções repercutem tanto em nível periférico, quanto no sistema nervoso central. Esses componentes são descritos por atuarem desde os processos celulares necessários para o desenvolvimento normal do cérebro até funções fisiológicas complexas no organismo já formado, tais como metabolismo energético, cognição, comportamento, sono e gestação.

Como a disponibilidade do triptofano no organismo está estreitamente ligada a quantidade e qualidade da dieta consumida, esta tese tem como **perguntas condutoras**: A desnutrição materna programa o metabolismo cerebral do triptofano na fase embrionária do desenvolvimento? Essas alterações persistem na vida adulta e podem ser transmitidas à segunda geração?

Assim, o **objetivo geral** desse trabalho foi de estudar o impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do triptofano cerebral. Os **objetivos específicos** foram:

- Efetuar uma análise quantitativa das vias metabólicas de triptofano no *forebrain* e *hindbrain* de embriões controles e desnutridos com 13 e 17 dias de vida intrauterina.

- Determinar o nível de expressão gênica das enzimas IDO, TPH2 e KMO no *forebrain* e *hindbrain* de embriões controles e desnutridos com 17 dias de vida intrauterina.
- Quantificar os metabólitos do triptofano no tronco cerebral, hipocampo e córtex pré-frontal de animais adultos controles e desnutridos da primeira geração.
- Determinar o nível de expressão gênica das enzimas IDO, TPH2 e KMO no córtex, tronco cerebral e hipocampo de animais adultos controles e desnutridos da primeira geração.
- Quantificar os metabólitos do triptofano no hipocampo e córtex pré-frontal de animais adultos controles e desnutridos da segunda geração.
- Traçar as características fenotípicas e o perfil metabólico dos animais adultos controles e desnutridos da segunda geração.

Nossa **hipótese** de trabalho é que desnutrição proteica materna altera o metabolismo cerebral do triptofano na fase embrionária do desenvolvimento cerebral e que essas modificações persistem na fase adulta e podem ser transmitidas à segunda geração.

Para dar subsídios teóricos a esta hipótese, serão apresentado na revisão bibliográfica elementos do conceito de programação nutricional, alterações estruturais e funcionais já observadas em outros trabalhos com a mesma temática. Além da apresentação detalhada do complexo metabolismo do triptofano, da via metabólica da serotonina, da quinurenina e sua relação com a desnutrição perinatal, assim como os aspectos relacionados à cognição e ao metabolismo energético e a transmissão transgeracional da programação metabólica.

Parte dos resultados oriundos deste trabalho são apresentados em forma de artigo e outra parte redigida como resultados suplementares. O artigo será enviado para publicação. Além do artigo submetido à publicação, os resultados desta tese foram apresentados em forma de resumos em congresso.

Vale salientar que por se tratar de uma tese em cotutela com a Universidade Federal de Pernambuco, a tese está sendo apresentada com um resumo em língua portuguesa. Desta forma, as normas de defesa e concessão de título se adequam à convenção de cotutela assinada entre a Universidade Federal de Pernambuco e a Université de Nantes.

Revisão Bibliográfica

9.2 Revisão bibliográfica

9.2.1 Programação e desnutrição perinatal

9.2.1.1 Hipóteses

Um aporte nutricional adequado é necessário para o bom desenvolvimento e crescimento do organismo. Estudos demonstraram a relação entre a situação nutricional do feto ou neonato e o estado de saúde desse indivíduo na vida adulta (Barker and Osmond 1988; Barker, Winter et al. 1989). Um exemplo seria o estudo desenvolvido em Hertfordshire (Inglaterra), onde foi encontrada correlação entre baixo peso ao nascer e no primeiro ano de vida com altas taxas de mortes por doenças cardiovasculares em longo prazo (Barker, Winter et al. 1989). Estes estudos conduziram ao desenvolvimento das chamadas hipóteses da origem fetal, em que foi sugerido que os acontecimentos no útero alteram permanentemente a estrutura e função dos órgãos em desenvolvimento, e consequentemente predispõe este organismo ao aparecimento de doenças no futuro (Barker 1995; Hales and Barker 2001; Bellinger, Lilley et al. 2004; Gluckman, Cutfield et al. 2005). Além disso, as pesquisas demonstraram uma relação existente entre o ambiente pré e pós-natal, onde aqueles organismos que foram expostos a um ambiente intrauterino pobre nutricionalmente e se depararam com um ambiente rico em nutrientes obtendo um rápido ganho de peso após o nascimento, também conhecido como *catch-up*, demonstraram ser de maior risco para doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta (Eriksson, Forsen et al. 1999). Várias hipóteses surgiram com o objetivo de esclarecer a base biológica da associação entre o ambiente perinatal e seu reflexo na vida adulta.

O modelo inicial foi denominado a hipótese de genótipo poupador, proposta por Neel, 1962 (Neel 1962). A base fundamental desta hipótese sugere que, na história evolucionária, genes que promovessem o armazenamento de gordura de maneira eficiente teriam vantagens evolutivas, porque permitiriam aos indivíduos que os possuísssem sobrevivência em períodos prolongados de escassez alimentar. Esses genótipos seriam muito vantajosos nas sociedades primitivas, que estavam expostas a períodos de restrição de alimento, permitindo um depósito eficiente de gordura, que garantiria a sobrevivência nessas fases de carência alimentar. Nas sociedades modernas, estes genes seriam desvantajosos porque promoveriam o

armazenamento de gordura, como preparação para uma fome que nunca viria, e o resultado, nos dias atuais, é um aumento na prevalência de obesidade e diabetes (Neel 1962). Se essa hipótese estivesse correta, a origem dessas doenças seria principalmente genética e sua incidência determinada pela hereditariedade, porém os estudos sobre as interações entre gene e ambiente demonstram que os efeitos puramente genéticos, os quais independem do meio, não têm um correlato biológico verdadeiro.

Diante às críticas sofridas pela hipótese de Neel, mais adiante surgiu a hipótese do fenótipo poupador, proposto por Hales e Barker (Hales and Barker 1992). A hipótese argumenta que a incidência da doença não pode ser explicada em termos genéticos e sim que o feto em desenvolvimento se adaptaria às condições de baixo aporte nutricional modificando seu metabolismo no sentido de melhorar o aproveitamento energético e aumentar a capacidade de estocagem de energia, garantindo assim sua sobrevivência. E adicionaram que se posteriormente houvesse uma incompatibilidade com os ambientes, como por exemplo, um aumento no aporte nutricional no período pós-natal, este organismo poderia apresentar alterações metabólicas levando a problemas cardiovasculares, diabetes tipo 2 e obesidade (Hales and Barker 1992).

Em paralelo aos estudos de Hales e Barker, no mesmo período, um grupo de pesquisadores concentrou-se no estudo dos efeitos da dieta utilizada por recém-nascidos pré-termos sobre diferentes desfechos tardios. Esses autores demonstraram, através de estudos clínicos, a influência dos diferentes tipos de dieta sobre o crescimento somático, imune e o desenvolvimento neuropsicomotor e propuseram o uso do termo “programação” nesse contexto (Lucas, Brooke et al. 1990; Lucas 1998). Esse termo refere-se ao conceito no qual um insulto ou estímulo aplicado em um período crítico ou vulnerável pode ter efeitos duradouros ou persistentes sobre a estrutura ou função de um organismo (Lucas 1991). Assim, o desenvolvimento e a gravidade de diversas condições mórbidas dependem, além da vulnerabilidade genética, da exposição à fatores ambientais adversos em períodos críticos do desenvolvimento, como na vida pré-natal e na infância, considerados assim por serem períodos de alta plasticidade (Khazipov and Luhmann 2006; Crews, He et al. 2007). Esse modelo foi largamente aceito, porém teve limitações. Enquanto ele podia explicar as consequências individuais do baixo peso ao nascer, ele não explicou como a programação

atua em fetos bem nutridos, já que a programação também pode ocorrer em indivíduos com o peso elevado ao nascer. Além disso, essa hipótese não explica alterações metabólicas que acontecem em resposta a variações do ambiente fetal e que não são imediatamente necessárias para a sobrevivência do indivíduo (Silveira, Maranhao et al. 2007).

Essas limitações levaram a modificações do modelo proposto por Lucas (1991) e outro paradigma de programação surge em 2004 sugerido por Gluckman e Hanson. Eles demonstraram que a possibilidade de resposta a um ambiente adverso ocorre sem a necessidade do benefício ser imediato, porém ela é feita na expectativa de um ambiente futuro. Essas respostas foram denominadas como respostas adaptativas preditivas (Gluckman and Hanson 2004). Um bom exemplo de uma resposta adaptativa preditiva é visto na ratazana do prado. Seus filhotes podem desenvolver diferentes espessuras de pele dependendo do fotoperíodo em que a mãe é exposta. Ou seja, mesmo os filhotes estando no útero a uma temperatura constante, a resposta preditiva é impulsionada pelo ritmo de melatonina materna antes do nascimento (Lee, Spears et al. 1989). Embora o ninho, ambiente pós-natal em curto prazo, seja semelhante ao útero, a espessura de revestimento é ajustada antes do nascimento para o ambiente semanas mais tarde, quando as crias saem do ninho. Por isso, a ratazana do prado evoluiu com uma estratégia para prever o futuro ambiente dos seus filhotes e tornou permanentes as respostas adaptativas em antecipação a esse futuro. O objetivo maior das respostas adaptativas preditivas é permitir, aos organismos em desenvolvimento, a utilização de sua capacidade de plasticidade para estabelecer um fenótipo pós-natal previsto adequado, possibilitando a melhor chance de sobrevivência para posterior reprodução quando adulto e assim preservar a continuidade da espécie (Gluckman and Hanson 2004).

O termo plasticidade do desenvolvimento, também conhecido como plasticidade fenotípica é definida como o fenômeno pelo qual um genótipo pode dar origem a uma gama de diferentes estados fisiológicos ou morfológicos em resposta a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento (West-Eberhard 2005). Como já discutido anteriormente, se o ambiente pós-natal é correspondente ao previsto, haverá consequências mínimas para o organismo, porém se o ambiente não é compatível com o previsto a resposta preditiva passa a ser inadequada podendo levar a consequências à saúde em longo prazo (Bateson, Barker et al. 2004). O risco para doenças, então, é o resultado do grau de

concordância ou contraste (*match or mismatch*) entre o ambiente previsto pelo indivíduo durante o período de alta plasticidade e o ambiente real em que este indivíduo vive no futuro (Gluckman and Hanson 2004a). Para exemplificar essa relação podem-se analisar as condutas de algumas correntes médicas as quais recomendam estimular e promover o crescimento do lactente com baixo peso visando a redução das taxas de morbimortalidade e preservação de aspectos neurocognitivos. Entretanto, é sabido que o rápido ganho de peso (*catch up*) neste período está associado a maior incidência de doença cardiovascular na maturidade (Singhal, Cole et al. 2004; Singhal, Cole et al. 2007). Os riscos para doenças cardiovasculares e para obesidade são consistentemente encontrados em grupos de indivíduos com um grande aumento no peso corporal entre o nascimento e a idade escolar ou pré-adolescência, primariamente naqueles que eram pequenos ou que tinham baixo peso ao nascer (Eriksson, Forsen et al. 2001; Bettiol, Sabbag Filho et al. 2007).

A hipótese proposta por Gluckman e Hanson foi essencial para o entendimento da relação do ambiente precoce com as repercursões futuras e se diferenciou das anteriores por explicar que as doenças crônicas não são programadas por si, mas a tendência para o desenvolvimento das doenças parece ser programada. Acrescentaram ainda que existem alguns fatores que devem ser levados em consideração por afetarem o crescimento fetal e que não necessariamente estão relacionados à nutrição. Um fator particular é o fenômeno da constrição materna, o qual o crescimento fetal é limitado pela incapacidade materna de realizar o parto vaginal. O mecanismo subjacente à constrição materna é pouco compreendido, mas podem incluir limitações na vasculatura uterina e na função placentária (Gluckman and Liggins 1984; Gluckman, Morel et al. 1992). Outro fator interessante é que os genes paternos podem exercer diferentes efeitos sobre o feto, como por exemplo, o fator de crescimento paterno, o IGF-2, o qual se encontra silenciado na mãe, desempenha importante papel no crescimento fetal (Haig and Graham 1991; Godfrey, Robinson et al. 1996). A idade materna também é um fator que pode afetar o crescimento fetal e não está relacionado com a nutrição. A explicação mais aceita é que as mães jovens tem prioridade de utilização dos nutrientes para seu próprio anabolismo e crescimento (Wallace, Bourke et al. 2001). Ademais, os autores discutem que existem muitos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento que podem ter impacto em longo prazo sem afetar o peso do feto no nascimento. Por exemplo, a

fome holandesa no inverno (Dutch Winter Famine), mulheres que comiam <800 calorias por dia no primeiro trimestre de gestação, tiveram crianças com peso normal no nascimento, porém se tornaram obesas na vida adulta (Ravelli, Stein et al. 1976; Ravelli, van Der Meulen et al. 1999), demonstrando que o termo plasticidade fenotípica não se restringe apenas quando se relaciona as alterações no crescimento do feto, mas um processo que acompanha as adaptações que cada feto produz em resposta ao ambiente.

Diante do exposto, a visão abrangente do termo programação nos permite analisar as inúmeras interações que ocorrem durante o desenvolvimento fetal e as variáveis envolvendo o ambiente na infância e adolescência e que, portanto, a melhor abordagem do problema é focar na perspectiva do curso da vida e suas interações com a história fetal e neonatal. Além disso, é sabido que o período em que esses eventos influenciam a vida em longo prazo se estendem desde a concepção (e, possivelmente, pré-implantação) (Kwong, Wild et al. 2000) até a infância. Por esse componente pós-natal levou-se à mudança da nomenclatura de origem fetal para origem desenvolvimentista da saúde e da doença, em inglês *Developmental origins of health and disease* (DOHaD) (Gluckman, Cutfield et al. 2005), a tão hoje estudada.

Muitos são os modelos utilizados na ciência para estudar os efeitos do ambiente sobre o desenvolvimento fetal. Modelos de animais têm fornecido subsídios diretos para o entendimento desse evento e sugerido que as consequências da programação são críticas para a sobrevivência de uma vasta gama de espécies (Bertram and Hanson 2001). A programação tem sido demonstrada em porcos, ovelhas, ratos e camundongos, podendo ocorrer nas fases precoces e tardias da gestação, lactação e ainda na fase pré-implantação (Kwong, Wild et al. 2000). Ela tem sido induzida por desnutrição perinatal seja calórica ou proteica, hipernutrição, disfunção na perfusão útero-placentário, por exposição materna aos glicocorticoides ou estresse. Dentre estas, a desnutrição proteica perinatal tem grande destaque por desenvolver um papel crucial no desenvolvimento de diversos órgãos e por fazer parte de um grande problema de saúde pública no mundo. Seus efeitos têm sido demonstrado ao longo dos últimos 40 anos em humanos (Scrimshaw, Taylor et al. 1968; Winnicki 1969; Tonkiss, Galler et al. 1993) e em animais (Dobbing 1968).

9.2.1.2 Desnutrição perinatal

O termo "desnutrição" significa que um ou mais nutrientes essenciais estão ausentes ou presentes, porém em proporções inadequadas no organismo. Em estudos experimentais, o modelo nutricional muito utilizado para a promoção de restrição do crescimento fetal é a indução da desnutrição por redução do conteúdo de proteína na dieta materna (Desai, Crowther et al. 1996). A extensão da restrição protéica materna, bem como, sua quantidade e qualidade, que caracteriza as dietas hipoprotéicas causa diversos efeitos sobre o desenvolvimento fetal e entre os mecanismos pelos quais as alterações ocorridas no ambiente materno podem ser transmitidas para o feto, a placenta desempenha um importante papel.

9.2.1.3 O papel da placenta

A placenta representa um dos mecanismos pelos quais as alterações ocorridas no ambiente materno podem ser transmitidas para o feto. A capacidade da placenta fornecer substratos ao feto irá depender da qualidade da placentação, do tamanho da placenta, das exigências da própria placenta por nutrientes, e da extensão das adaptações materna diante a gravidez que exige, por exemplo, o aumento do débito cardíaco para melhorar a perfusão placentária (Harding, Piacentino et al. 2001). A perfusão placentária reduzida que ocorre na pré-eclâmpsia está associada com retardo do crescimento fetal (Poston 2006). A placenta também é uma fonte importante de sinais do sistema endócrino. Embora alguns hormônios desempenhem um papel na manutenção da gravidez, outros estão envolvidos na modulação da taxa de crescimento e na maturação do cérebro e de outros órgãos no feto. A corticotropina, por exemplo, desempenha um papel importante na maturação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e dos pulmões do feto.

É concebível também que os déficits ou desequilíbrios na qualidade ou quantidade de nutrição materna podem contribuir para a programação simplesmente pela restrição do fornecimento de substrato para o feto. No dia 14,5 de gestação, ratas alimentadas com dieta pobre em proteína tinham fetos menores, mas o tamanho placentário similar aos controles, porém no dia 18,5, tanto o peso fetal quanto placentário foram reduzidos (Rutland, Latunde-Dada et al. 2007). Foi observado também alterações no comprimento dos vasos sanguíneos placentários (Rutland, Latunde-Dada et al. 2007). Dieta pobre em proteína foi associada com

perturbação da expressão de caderina e p-catenina no endotélio vascular. Estas moléculas de adesão são reguladores de integridade e permeabilidade juncional da placenta (Dejana 1996).

Uma série de estudos reportados por Powell e Jansson mostrou que a expressão de glicose placentária e transportadores de aminoácidos e, portanto, o fornecimento de substratos para o feto pode ser modulado pelo estado nutricional materno. Jansson et al. (2006) relataram que a baixa ingestão de proteína em ratos regulou negativamente um transportador de aminoácidos e sugeriram que este efeito pode ter sido impulsionado por baixas concentrações de insulina, leptina e IGF-1 na circulação materna.

Vários sistemas de transporte estão envolvidos na transferência de aminoácidos através da placenta. Usando um modelo de restrição proteica na dieta materna, estudos recentes têm demonstrado que o transporte materno-fetal de metil-amino-iso-butirato (um análogo da alanina) é regulado negativamente *in vivo*, impactando sobre o crescimento fetal, sugerindo que o transporte prejudicado de aminoácidos placentário pode ser a causa da restrição do crescimento intrauterino (Jansson, Pettersson et al. 2006). Além disso, as atividades do sistema A e sistema L são mais baixas em tecidos isolados de placenta de gestantes desnutridas, afetando os níveis de aminoácidos no feto (Jansson, Pettersson et al. 2006; Jansson and Powell 2006; Lin, Liu et al. 2012).

Tendo em vista a importância da placenta no intercâmbio materno-fetal e suas alterações devido à desnutrição materna, analisamos agora, baseado no conceito do DOHaD, uma série de estudos que demonstram as repercussões da desnutrição proteica materna sobre o funcionamento do cérebro e de vários órgãos periféricos relacionados aos aspectos cognitivos e metabólicos do organismo.

9.2.2 Sistema serotoninérgico

9.2.2.1 Conceito

A 5-HT é um produto sintetizado a partir do precursor Trp através da ação de duas enzimas. O aminoácido Trp é hidroxilado pela triptofano hidroxilase (TPH) tendo como produto o 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (Clark et al. 1954). Na segunda, o 5-HTP é descarboxilado pelo aminoácido aromático descarboxilase (AADC), formando a 5-HT

(CLARK *et al.*, 1954) (Figura 1). Estudos farmacológicos iniciais demonstraram que as reações de hidroxilação e descarboxilação ocorriam quase que instantaneamente na presença do Trp (CLARK *et al.*, 1954). A degradação da 5-HT se dá por meio da ação da monoamina oxidase (MAO) (Sandler, Reveley *et al.* 1981). Existem dois tipos de MAO, a MAO-A e B. A primeira é responsável pela metabolização da 5-HT encefálica. A MAO-B age primordialmente sobre a 5-HT periférica (plaquetas e células enterocromafins). A 5-HT é liberada por vesículas na fenda sináptica onde pode ser ligada aos seus receptores específicos. O mecanismo de recaptação remove a 5-HT da fenda sináptica para neurônios presinápticos onde é metabolizada em ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-Hiaa).

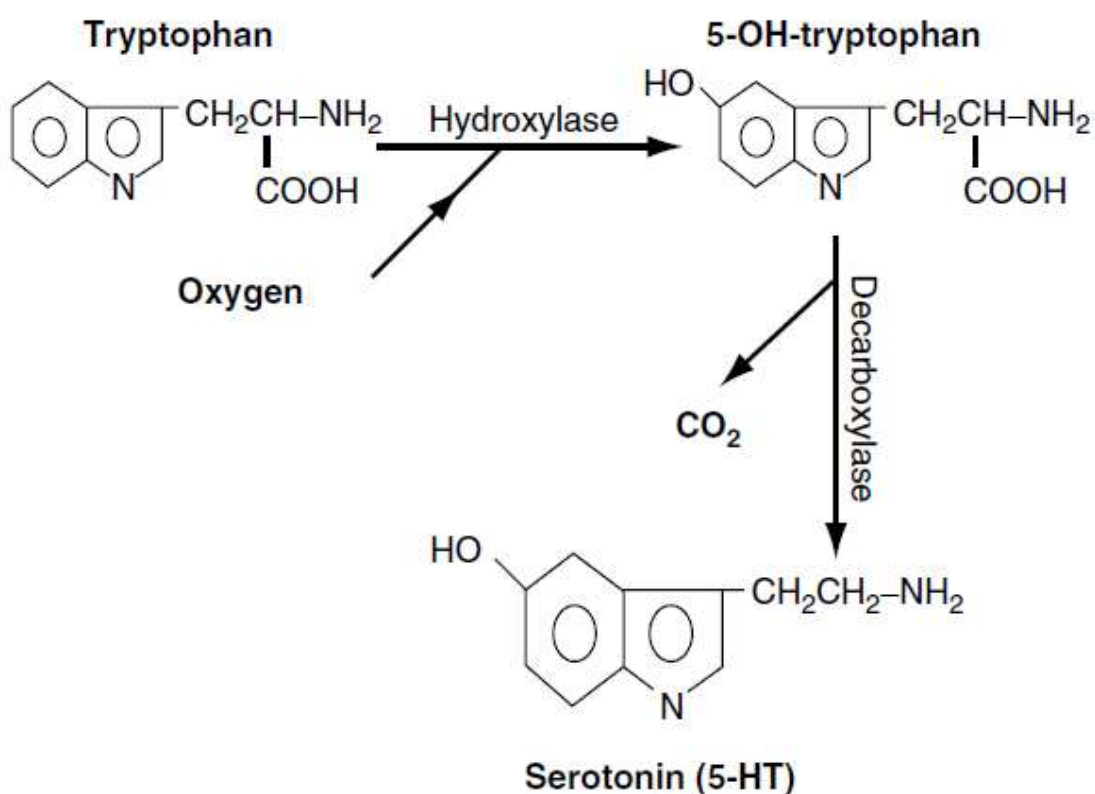


Figura 1. Esquema da síntese de serotonina a partir do triptofano. Duas enzimas são envolvidas, a triptofano hidroxilase e aminoácido aromático descarboxilase.

9.2.2.2 Breve histórico

A 5-HT foi isolada e caracterizada em meados de 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page (Rapport et al. 1948). O isolamento da 5-HT ocorreu após décadas de investigações que tinham como objetivo caracterizar uma substância vasoconstritora supostamente presente em plaquetas. (Janeway 1918, Zucker, 1944). Inicialmente, a agregação plaquetária foi considerada seu papel principal no sangue, podendo desempenhar alguma função na hemostasia (Rapport, Green et al. 1948; Humphrey and Jaques 1954). A concepção do nome 5-HT advém do radical latim *serum* (soro) e da palavra *tonic*, de origem grega.

Após a descoberta da 5-HT, muitos pesquisadores conduziram estudos paralelos para definir a sua localização assim como sua função. Ao longo dos últimos 60 anos, a função da 5-HT foi estudada sobre o tônus vascular, anormalidades na função vascular cerebral e das funções cardíacas normais, tais como frequência cardíaca, contratilidade e débito cardíaco (Cote, Fligny et al. 2004). O tônus vascular é parcialmente controlado pela ativação dos receptores de 5-HT no endotélio vascular e células do músculo liso (Yildiz, Ehlert et al. 1998; Nilsson, Longmore et al. 1999). A 5-HT tem tanto uma função contrátil ou dilatadora baseado no subtipo de receptor e o local de ação (Nilsson, Longmore et al. 1999). A função da 5-HT também foi descrita nas células intestinais (Peroutka 1994). Bulbring e Crema (1958) demonstraram que a 5-HT estimula o movimento peristáltico e reflexos secretores intestinais. A 5-HT é produzida no intestino por células enterocromafins e pelos neurônios dos plexos mioentéricos. Apesar da sua importância nos órgãos e sistemas periféricos, essa substância tem sido descrita principalmente como neurotransmissor, atuando em nível cerebral.

A 5-HT foi detectada no cérebro em 1953 por Twarog e Page (Twarog and Page 1953). Dahlstrom & Fuxe (Dahlstrom and Fuxe 1964) foram os primeiros a mapear núcleos específicos no cérebro que continham 5-HT. Esse grupo de neurônios ficou conhecido como sistema serotoninérgico. Nessa época, 5-HT era apenas o terceiro neurotransmissor descoberto. Em 1957, Gaddum e Picarelli relataram a existência de vários subtipos de receptores de 5-HT e os nomearam como 5-HT-H e 5-HT-D. Peroutka and Snyder (Peroutka, Lebovitz et al. 1979) reclassificaram esses receptores baseados em estudos utilizando o método de radioligantes. Posteriormente, a aplicação de técnicas de clonagem molecular no final dos anos 1980 revolucionou a descoberta de proteínas e assim permitiu a clonagem de 14 subtipos distintos de receptores de 5-HT (Pazos, Cortes et al. 1984). Tanto sua estrutura

molecular quanto suas propriedades farmacológicas determinaram sua classificação. Atualmente, os receptores de 5-HT são distribuídos em sete famílias distintas (Hoyer, Clarke et al. 1994). Através desses receptores, a 5-HT está envolvida em muitas atividades comportamentais, incluindo agressividade, sono, alimentação, atividade locomotora, atenção, aprendizagem, memória, e atividade sexual. Além disso, ela regula alguns mecanismos fisiológicos, tais como: temperatura, respiração, fluxo de sangue e de coagulação, osmolaridade, e secreção hormonal. A organização dos neurônios serotoninérgicos no cérebro em desenvolvimento e já formado tem sido extensamente revisada (Azmitia, Buchan et al. 1978; Parent 1981; Jacobs and Azmitia 1992).

9.2.2.3 Serotonina e desenvolvimento cerebral

Neurônios serotoninérgicos são parte dos sistemas neuronais mais amplamente distribuídos no cérebro de mamíferos. Antes do seu papel como neurotransmissor vital no cérebro adulto, a 5-HT atuava como um regulador do desenvolvimento cerebral. O cérebro imaturo produz excessivas conexões e células. Porém elas são podadas de acordo com seu nível de atividade por mecanismos apoptóticos guiadas por sistemas químicos existentes. Como a 5-HT está presente precocemente no desenvolvimento do que outros sistemas de neurotransmissores e já que a taxa de utilização da 5-HT é mais elevada no cérebro de mamíferos imaturos do que em qualquer outro período (Hamon and Bourgoin 1979), a 5-HT, provavelmente, desempenha um papel fundamental neste processo de desenvolvimento do cérebro (revisado por (Whitaker-Azmitia 2001).

Existem dois grandes grupos de neurônios serotoninérgicos que aparecem durante o período embrionário e parecem ter distintos padrões de maturação e migração (Lidov and Molliver 1982; Wallace and Lauder 1983). O grupo anterior (núcleo dorsal da rafe, por exemplo) projeta-se rostralmente para o *forebrain*, tálamo e hipotálamo, enquanto o grupo caudal projeta-se caudalmente e ventralmente para inervar medula espinhal e cerebelo respectivamente. Neurônios serotoninérgicos inervam quase todas as áreas do cérebro (Jacobs e Azmitia, 1992), suas projeções estão resumidas na Figura 2.

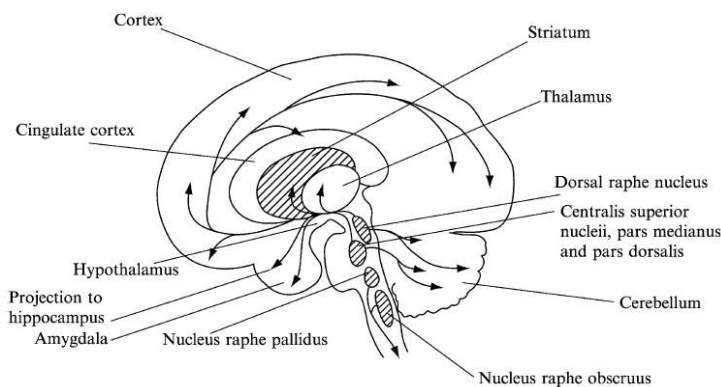


Figura 2. Projeções serotoninérgicas no cérebro humano partindo do núcleo da rafe.

Os maiores níveis de atividade serotoninérgica são detectados no início do desenvolvimento (Lidov e Molliver, 1982). No ser humano, os neurônios serotoninérgicos podem ser detectados quando o embrião está apenas com 5 semanas de idade (Sundstrom, Kolare et al. 1993), com um rápido crescimento e multiplicação até a 10ª semana de gestação (Shen, Luo et al. 1989; Kontur, Leranthe et al. 1993; Levallois, Valence et al. 1997). Após 15 semanas, o agrupamento dos corpos celulares serotoninérgicos é observado nos núcleos da rafe. A densidade sináptica de sistemas de aminas biogênicas no córtex cerebral humano dobra desde o nascimento até 1 ano de idade, quando se atinge seu pico e depois diminui para níveis que permanecem até a idade adulta (Huttenlocher and Dabholkar 1997). Da mesma forma, os níveis de 5-HT aumentam durante os 2 primeiros anos após o nascimento e, em seguida, diminui para níveis que permanecem até a idade adulta (Hedner, Lundell et al. 1986; Toth and Fekete 1986). O início da chegada do sistema serotoninérgico antes de outras monoaminas indica que a 5-HT pode ser necessária para guiar o desenvolvimento de outros sistemas de neurotransmissores (Whitaker-Azmitia, Druse et al. 1996; Benes, Taylor et al. 2000). O curso de tempo equivalente para o desenvolvimento do sistema serotoninérgico tem sido observado em roedores (Rubenstein 1998).

Em rato, as projeções axonais dos núcleos da rafe rostral ascendem ao mesencéfalo e ao *forebrain*, enquanto que as dos núcleos caudais descem para a medula espinhal (Wallace and Lauder 1983). As fibras descendentes entram na medula espinhal no dia embrionário 14 (E14) e inervam os neurônios simpáticos pré-ganglionares e neurônios motores somáticos. No E17 eles começam a formar sinapses e inervam os neurônios do corno dorsal. As projeções

rostrais são visíveis logo depois que a 5-HT é detectada no tronco cerebral. As fibras não ramificadas crescem na zona marginal, como um fascículo no *forebrain* e por volta do E15 eles atingem o diencefalo, onde se ramificam. No E17, fibras mediais do *forebrain* projetam-se ao telencéfalo, enquanto as fibras laterais projetam-se ao hipotálamo e chegam à extremidade rostral do cérebro. Há uma entrada simultânea de fibras de 5-HT no telencéfalo, a maioria entra pela banda de Broca, áreas do septo, e, em seguida, projetando-se para o córtex cerebral (Rubenstein, 1998).

Durante o desenvolvimento cerebral os neurônios serotoninérgicos são influenciados por fatores de crescimento os quais atuam sobre a plasticidade sináptica. Entre eles, incluem os níveis do fator de crescimento astrogliar e do *calcium-binding protein B*, os quais são aumentados na presença de 5-HT e inibidos nos terminais serotoninérgicos. Ademais, destaca-se a função do fator neurotrófico derivado de cérebro e seus receptores, entre várias outras moléculas que são ativadas sob influência serotoninérgica (Herdegen and Leah 1998). Além disso, *Petl*, um fator de transcrição, está intimamente associado com o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe. Outros fatores neurotróficos e de crescimento controlam a diferenciação de neurônios serotoninérgicos, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas e fator neurotrófico ciliar (Hendricks, Francis et al. 1999). O sistema da 5-HT regula a sua diferenciação também pela ativação de tipos diferentes de receptores serotoninérgicos.

9.2.2.4 Fonte exógena de 5-HT

Os neurônios serotoninérgicos aparecem cedo no *hindbrain* fetal e pode fornecer uma fonte endógena de 5-HT no cérebro. Porém, fontes exógenas de 5-HT foram sugeridas, pois foi observado que receptores de 5-HT são expressos no *forebrain* rostral e craniofacial dias antes do surgimento de axônios serotoninérgicos. Pesquisas sugerem que existem múltiplas fontes de neurotransmissores, como a 5-HT, durante o desenvolvimento fetal, incluindo o intestino fetal e a circulação materna (Lauder, Wallace et al. 1981; Yavarone, Shuey et al. 1993).

Um recente estudo analisou as concentrações de 5-HT em todo período embrionário de diferentes áreas do cérebro de ratos *Pet-1*^{-/-} (onde 70-80% dos neurônios da rafe não sintetizam 5-HT) e ratos tipo selvagem da mesma ninhada, a fim de reunir evidência direta sobre a fonte exógena de 5-HT. Eles observaram uma redução drástica de 5-HT nos ratos *Pet-1*^{-/-} durante o desenvolvimento fetal. No entanto, em idades precoces (E10.5 a E15.5) os níveis 5-HT se apresentaram normais no *forebrain* de embriões *Pet-1*^{-/-} em comparação com os controles da mesma ninhada e a partir de E16.5, a concentração de 5-HT se encontrava reduzida, tempo que corresponde ao momento que os axônios que se originam no núcleo da rafe atingem o *forebrain* (Bonnin and Levitt 2011). A acumulação diferencial de 5-HT no *forebrain*, mas não no *hindbrain* em embriões *Pet-1*^{-/-} em desenvolvimento indica que há uma transição marcante de uma fonte exógena precoce e uma endógena tardia de 5-HT (Figura 3).

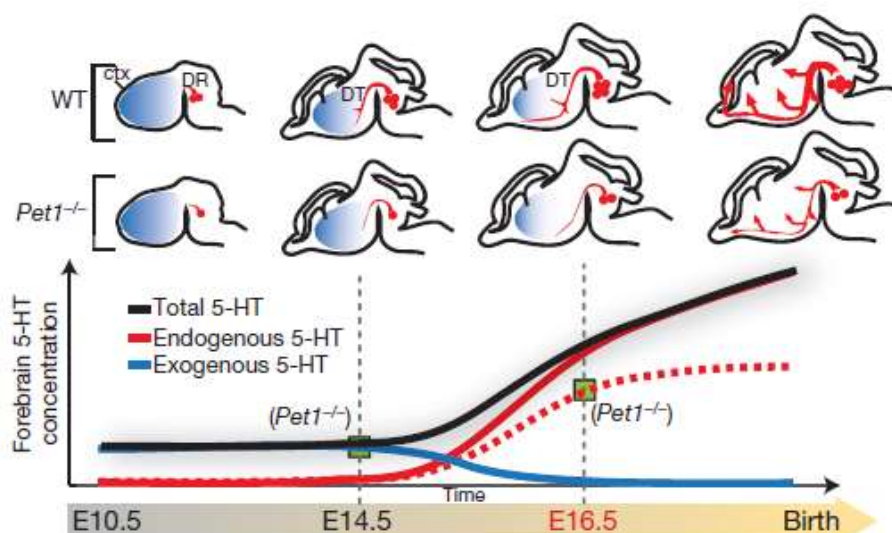


Figura 3. Representação esquemática das contribuições endógenas e exógenas de 5-HT em diferentes idades embrionárias em ratos *Pet1*^{-/-} e ratos selvagens (Bonnin et al. 2011).

Algumas hipóteses foram testadas na tentativa de identificar a fonte responsável pela produção exógena de 5-HT nas fases precoces de desenvolvimento. Os autores demonstraram num estudo *ex vivo* a possibilidade do precursor e essencial aminoácido Trp de origem materna ser convertido em 5-HT na placenta e entregue para a circulação fetal (Bonnin et al., 2011). Dentro de minutos após a injeção de Trp através da artéria uterina materna, foi

observada grande acumulação de 5-HT recém-sintetizada, demonstrando que a placenta é capaz de converter Trp em 5-HT e ser entregue para a circulação fetal. Estudos moleculares e imunohistoquímicos confirmaram que as enzimas de biossíntese de 5-HT são expressas na placenta nos períodos E10.5, E14.5, e E18.5. (Bonnin et al. 2011). Para estabelecer capacidade de síntese placentária e transporte de 5-HT para o feto *in vivo*, Bonnin et al. bloquearam atividade enzimática da TPH1 por microinjeção de pequenos volumes de p-clorofenialanina (PCPA) diretamente na placenta no período E14.5 (Bonnin et al., 2011). Esta manipulação farmacológica reduziu significativamente os níveis de 5-HT na placenta e no *forebrain* fetal, mas não no *hindbrain* do feto. Esses estudos *in vivo* e *ex vivo* demonstram que uma fonte exógena de 5-HT produzido na placenta é necessária para manter níveis normais de 5-HT no *forebrain* durante as fases iniciais do desenvolvimento fetal (Figura 4) e que alterações no ambiente materno pode repercutir na manutenção do sistema serotoninérgico fetal e assim, ter profundo impacto no funcionamento normal desse órgão. Estudos têm voltado sua atenção para as perturbações que podem ocorrer no sistema serotoninérgico durante os períodos precoces do desenvolvimento com repercussões a longo prazo. Entre os tipos de perturbações, destaca-se a desnutrição materna.

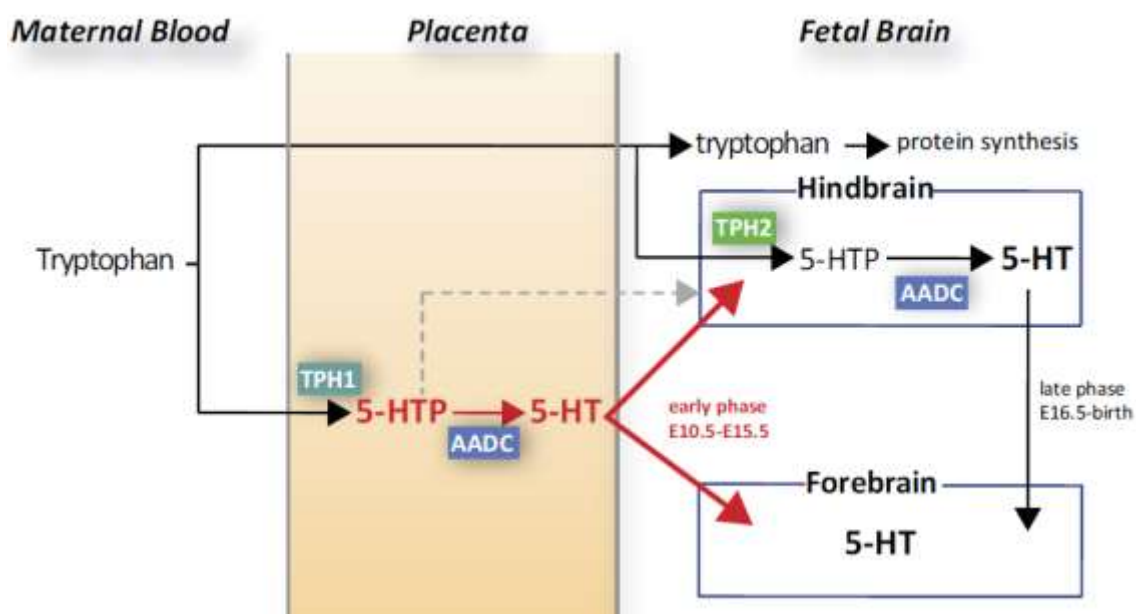


Figura 4. Novo modelo de contribuição de serotonina para o cérebro fetal. A placenta sintetiza 5-HT e 5-HTP a partir do Trp materno e serve como fonte de 5-HT para o *forebrain* durante a fase inicial de desenvolvimento (E10 a E15) (Bonnin and Levitt, 2011).

9.2.2.6 Sistema serotoninérgico e desnutrição materna

Indivíduos ou animais experimentais que sofreram desnutrição no útero ou durante os primeiros estágios pós-natal apresentaram déficits de aprendizagem e memória, uma maior susceptibilidade ao estresse e reduziu as respostas do sistema nervoso central a drogas psicoativas (Almeida, Tonkiss et al. 1996; Morgane, Mokler et al. 2002). Em adição a essas anormalidades comportamentais, deficiência de nutrientes precoce produz alterações em vários sistemas de neurotransmissores (Wiggins, Fuller et al. 1984; Almeida, Tonkiss et al. 1996). A 5-HT é um neurotransmissor amplamente estudado que desempenha um papel importante no desenvolvimento e funcionamento do organismo ao longo da vida. O aparecimento do sistema serotoninérgico cedo durante a embriogênese sugere a hipótese de que a 5-HT desempenha um papel regulador no neurodesenvolvimento. Alguns estudos tem abordado o impacto a curto e longo prazo da desnutrição durante períodos precoces da vida sobre o sistema serotoninérgico.

Em 1975, Stern et al. documentaram que ratos submetidos a desnutrição proteica durante o desenvolvimento apresentaram uma concentração elevada de 5-HT em regiões do cérebro e em tecidos periféricos no nascimento e ao 11º e 30º dias de vida, sugerindo que a desnutrição afeta o metabolismo da 5-HT e que o cérebro não é poupado a partir de mudanças neuroquímicas observadas em órgãos periférico (Stern, Morgane et al. 1975). Concordando com esses resultados, Resnick and Morgane (1984) demonstraram que ratos cujas mães foram expostas a dieta pobre em proteína (caseína 6%) durante o período gestacional apresentaram aumento nas concentrações de 5-HT cerebral, assim como do seu aminoácido precursor, o TrP (Resnick and Morgane 1984).

Respostas em longo prazo foram documentadas em animais aos 220 dias de vida cujas mães foram expostas à dieta pobre em proteína (caseína 6%) durante os períodos de gestação e lactação. Eles apresentaram aumento na liberação de 5-HT em tecidos do hipocampo (Chen, Tonkiss et al. 1992; Chen, Yoshida et al. 1995) e aumento na resposta da liberação de 5-HT

após estimulação elétrica do núcleo medial da rafe (Mokler, Bronzino et al. 1999). Em contraste com os estudos sobre os níveis de 5-HT e sua liberação no cérebro, estudos demonstraram uma diminuição acentuada na inervação serotoninérgica no hipocampo dos animais desnutridos (Blatt et al. 1994). Uma possível explicação para um aumento da liberação basal de 5-HT pode ser um evento compensatório da redução da sua inervação envolvendo uma diminuição na regulação dos seus autorreceptores tanto no núcleo rafe como no hipocampo.

Manjarrez-Gutiérrez et al. (2012) propuseram que a elevação crônica dos níveis de 5-HT observado no cérebro da prole submetidos à desnutrição perinatal é provavelmente devido a uma alteração na atividade da enzima TPH1; enzima responsável pela síntese de 5-HT (Manjarrez-Gutierrez, Martinez-Radilla et al. 2012). Estes resultados são interessantes porque foi relatado e aceito que a TPH1 aparece preferencialmente no rato adulto em diferentes órgãos periféricos (glândula pineal, intestino, coração, timo, baço, pulmões, etc.) em comparação com TPH2 que, inicialmente, acreditavam que era expresso em neurônios serotoninérgicos localizados no cérebro. No entanto, o aparecimento de TPH1 foi observado no nascimento, o que sugere fortemente a sua atividade no cérebro no período pré-natal (Manjarrez-Gutierrez, Martinez-Radilla et al. 2012).

A partir desses estudos, despertou-se o interesse em relacionar algumas modificações comportamentais de animais desnutridos com a alteração do sistema serotoninérgico, já que esse neurotransmissor está envolvido em várias funções fisiológicas. Foi documentado que a administração do ansiolítico, clordiazepóxido benzo diazepino, em animais desnutridos, reduziu a liberação de 5-HT no hipocampo (Mokler, Galler et al. 2003). Os benzodiazepínicos é conhecido por reduzir os níveis extracelulares de 5-HT em ratos estressados, sugerindo que a redução da liberação de 5-HT no hipocampo em ratos expostos à desnutrição proteica pré-natal pode estar associada com um aumento da resposta do animal ao estresse (Mokler, Galler et al. 2003). Em paralelo, ratos desnutridos durante a gestação apresentam um aumento dos níveis de 5-HT e 5-HIAA quando esses animais são expostos a separação materna após o nascimento, um modelo de estresse bastante utilizado nas pesquisas experimentais (Kehoe et al., 2001).

Estudos tiveram como objetivo estudar o efeito da fluoxetina (inibidor da receptação de serotonina) sobre a agressividade de ratos adultos expostos à desnutrição durante o período de lactação. Foi demonstrado que a fluoxetina reduz a agressividade em animais controles, fato não observado nos animais desnutridos, sugerindo que o sistema serotoninérgico é afetado pela desnutrição durante os períodos críticos do desenvolvimento (Barreto-Medeiros, Feitoza et al. 2004). A fluoxetina também foi utilizada para avaliar o comportamento do sistema imune dos animais expostos à desnutrição durante o período de lactação. Foi demonstrado que a liberação de óxido nítrico na presença de fluoxetina é reduzida em macrófagos alveolares de animais desnutridos durante o período de desenvolvimento (Ferreira, Galvao et al. 2009). Também foi documentado que ratos desnutridos durante o período de gestação apresentam alteração no ciclo de sono-vigília e esse fato foi associado com as alterações encontradas nos níveis de 5-HT cerebral. As alterações do sono pode ter impacto no comportamento social e nas funções cognitivas desses animais (Datta and Hobson 2000).

Surgiu o interesse das investigações das influências da desnutrição durante o período de desenvolvimento fetal sobre os receptores de 5-HT. Observou-se, em animais adultos desnutridos durante a gestação, um aumento na densidade de receptores 5-HT_{1A}, acompanhados por uma elevação dos níveis de 5-HT no tronco cerebral e no córtex cerebral, o que sugere que o mecanismo de regulação da expressão dos receptores de 5-HT no momento do nascimento não parece depender do aumento da quantidade de neurotransmissor ao nível sináptico, porque, neste caso, seria de esperar que os animais desnutridos tivessem uma densidade mais baixa desses receptores comparado com a baixa regulação observadas no cérebro adulto (Manjarrez et al. 2003).

Os níveis de expressão gênica do receptor 5-HT_{1A} em animais desnutridos foram investigados. Manuel-Apolinar et al. (2014) demonstraram que a desnutrição calórica aumentou a expressão desse receptor no hipotálamo dos animais e associaram esse achado com a hiperfagia apresentada no período pós natal e na vida adulta (Manuel-Apolinar et al., 2014). Lopes de Souza et al (2008), documentaram que a restrição de proteína durante o desenvolvimento perinatal atenua a ação inibidora da 5-HT sobre o consumo de alimentos através da redução na sensibilidade dos receptores 5-HT_{1B} (Lopes de Souza, Orozco-Solis et

al. 2008). Estes resultados são consistentes com a ideia de que as alterações adaptativas da sinalização de 5-HT desenvolvem para compensar os elevados níveis cerebrais de 5-HT induzido por desnutrição precoce. Dentro do contexto da hipótese de programação fetal da obesidade, essas observações indicam que a hiperfagia induzida no útero e/ou restrição de nutrientes neonatal está relacionada com a redução da função anoréxica da 5-HT sobre a ingestão de alimentos.

Diante do exposto, é evidente o extenso impacto da desnutrição materna sobre o sistema serotoninérgico. Considerando que a 5-HT é um dos metabólitos do Trp, é grande o interesse de se investigar as repercussões da desnutrição materna sobre o metabolismo desse aminoácido, o qual não se restringe apenas a via metabólica da 5-HT.

9.2.3 Metabolismo do triptofano

Aminoácidos são não só reguladores de expressão gênica e das cascatas de fosforilação proteica, mas são também moléculas de sinalização celular. A fórmula esquelética dos aminoácidos essenciais não pode ser sintetizada por células de animais e dessa forma, deve ser adquirida unicamente através da dieta (Wu 2000). O Trp é um dos aminoácidos essenciais conhecidos. Ele é encontrado em todo o espectro filogenético desde plantas até mamíferos superiores. Considerado evolutivamente como um antigo composto químico. Sua estrutura é mostrada na figura 5. O Trp é capaz de absorver luz e é de vital importância para a produção de energia durante a fotossíntese. Essa característica é atribuída pela presença de um *indole ring* em sua estrutura. O Trp pode ser convertido em auxina, um fator trófico, guiando o crescimento e a diferenciação celular em plantas (Azmitia 2001).

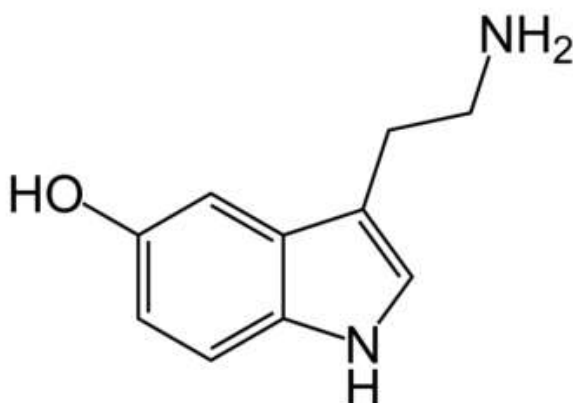


Figura 5. Estrutura química do triptofano.

Em maníferos, ao contrário de outros aminoácidos, o Trp circula no sangue e no plasma ligado principalmente à albumina (Pardridge 1979). Apenas 10-20% de Trp está presente como forma livre no plasma. Uma das funções fisiológicas importantes do Trp no corpo é a sua utilização na síntese proteica, porém a quantidade média de proteína sintetizada no corpo a partir do Trp é cerca de 1,2 g por 100 g de proteína total, valor baixo comparado com outros aminoácidos indispensáveis, tais como a lisina, representando 7,6g, leucina (7,1g) e treonina (4,0g) (Mahan, Shields 1998). O ser humano adulto sintetiza e degrada 300 g de proteína por dia então cerca de 3- 3,6 g de Trp é incorporado e libertado das proteínas a cada dia (Garlick, Clugston et al. 1980). Além de ser parte estrutural das proteínas, o Trp é o precursor de importantes componentes fisiológicos, como da 5-HT e da KYN. Um dos fatores que influencia a disponibilidade de Trp como substrato de ambos os componentes acima citados é o nível de Trp livre no plasma.

A síntese de 5-HT é proporcional ao transporte de Trp para dentro do cérebro (Pardridge 1998). O Trp é transportado para dentro do cérebro por um transportador localizado nos capilares da barreira hematoencefálica. Esse transportador é compartilhado com os aminoácidos neutros como leucina, valina, isoleucina, os três aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), tirosina, fenilalanina e metionina. Consequentemente, a entrada do Trp no cérebro é influenciada pela relação entre o Trp com os aminoácidos que partilham o mesmo transportador, particularmente o BCAA, que estão presentes numa maior proporção do que o Trp no plasma (Pardridge 1998). O Trp ligado à albumina parece também influenciar seu transporte para dentro do cérebro (Pardridge 1993). Resnick e Morgane sugeriram que esse resultado pode estar relacionado com a diminuição na proporção de Trp livre ou ligado à albumina no plasma de animais desnutridos. Sabe-se que os ratos desnutridos apresentam menores níveis de albumina, em comparação com os animais controles (Resnick and Morgane 1984). Assim, ocorre uma elevação da fração livre de Trp plasmático após o nascimento sugerindo um aumento do transporte desse aminoácido para o cérebro, com um possível aumento da síntese de 5-HT durante o período crítico de diferenciação cerebral (Resnick and Morgane 1984).

Dessa forma, o aumento nos níveis de 5-HT está diretamente relacionado com o transporte desse aminoácido em nível cerebral, fato que pode depender do aumento das concentrações de Trp na dieta ou no plasma (Henry, Seve et al. 1992; Henry 1996; Sarwar and Botting 1999). Ao contrário, a deficiência de Trp impede a síntese de 5-HT no cérebro (Henry 1996). Estudos experimentais observaram que a queda nos níveis de 5-HT no cérebro pode ser devido à ingestão de uma dieta rica em aminoácidos, porém livre de Trp, o qual leva ao aumento da síntese proteica, porém redução na síntese de 5-HT cerebral (Nishizawa, Benkelfat et al. 1997; Lieben, Blokland et al. 2004). Como já abordado, o sistema serotoninérgico desempenha um papel importante na regulação de vários processos fisiológicos e comportamentais, tais como o humor, a cognição, a atividade física, sono e apetite. Uma função serotoninérgica no cérebro alterada pela disponibilidade inadequada de Trp é, portanto, reconhecido como um fator que contribui para transtornos afetivos, ansiedade, agressividade, estresse, distúrbios alimentares e outros.

Estudos clínicos fornecem evidências que níveis alterados de Trp podem afetar estados de humor. Os efeitos benéficos do aumento dos níveis de Trp são observados em pacientes com depressão leve a moderada (Young and Leyton 2002). Estudos controlados com placebo demonstraram a capacidade do Trp de potencializar a ação antidepressiva dos inibidores da MAO e de desempenhar efeitos equivalentes a amitriptilina, fármaco que aumenta as concentrações plasmáticas de 5-HT (Thomson et al. 1982). No entanto, em indivíduos saudáveis, a literatura indica que o aumento da concentração de Trp tem efeitos mínimos ou nenhum sobre o humor (Silber and Schmitt 2010). Além disso, a deficiência de Trp induz alterações na ansiedade e depressão em ratos (Blokland, Lieben et al. 2002). De forma semelhante, a redução dos níveis de Trp aumenta a ansiedade e irritabilidade em seres humanos que sofrem de distúrbios psiquiátricos (Russo, Kema et al. 2003). Diferentes estudos em animais mostraram também que o aumento dos níveis de Trp pode atenuar a agressividade (Gibbons, Barr et al. 1979; Shea, Mench et al. 1990). Em testes de laboratório, uma redução na agressividade foi encontrada em grupos que receberam suplementação de Trp comparado com os grupos que receberam quantidade mais baixa desse aminoácido (Pihl, Young et al. 1995; Bjork et al., 2000).

Melhoria nos aspectos cognitivos, como na memória em longo prazo foram demonstrados em indivíduos após suplementação com Trp (Silber and Schmitt 2010). Por outro lado, a depleção aguda desse aminoácido prejudica a memória episódica, bem como o reconhecimento em teste de aprendizado auditivo-verbal (Mendelsohn, Riedel et al. 2009). As diferentes respostas aos níveis de Trp plasmático também foram relatadas entre sexos. Foi demonstrado que fêmeas tem um maior processamento de estímulos emocionais após a suplementação com Trp (Silber and Schmitt 2010) e uma maior vulnerabilidade aos efeitos da depleção aguda de Trp sobre a memória episódica (Sambeth, Blokland et al. 2007). O metabolismo do Trp também está envolvido no controle do eixo hipotalâmico-pituitário-supra-renal (HPA) (Markus, Firk et al. 2008). Foi demonstrado que os aumentos nos níveis de Trp plasmático melhora o humor e reduz a resposta do cortisol após a exposição ao estresse em indivíduos doentes e saudáveis (Markus, Olivier et al. 2000; Firk and Markus 2009). Os estudos em animais também revelam que, em suínos, a suplementação de Trp (3-4 vezes maior do que o recomendado) pode levar à redução basal nas concentrações de cortisol plasmático diminuindo assim a resposta ao estresse do eixo HPA (Koopmans, Ruis et al. 2005; Guzik, Matthews et al. 2006; Koopmans, Guzik et al. 2006).

O Trp é também o precursor de outro metabólito estável chamado KYN. Duas enzimas são capazes de catalisar a conversão do Trp em KYN: triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Estas duas enzimas diferem pela sua localização no tecido (Figura 6), sua estrutura química, especificidade do substrato, função e tem diferentes afinidades pelas várias isoformas de Trp (Rafice, Chauhan et al. 2009). TDO pode ser induzida pela ligação de corticosteróides nos seus receptores ou por citocinas pró-inflamatórias e está localizada principalmente no fígado. A IDO é difundida em numerosos tecidos, inclusive no cérebro, uma vez que essa enzima é expressa em astrócitos, macrófagos, na micróglia e em células dendríticas (Ruddick, Evans et al. 2006). A IDO é induzida diretamente por citocinas pró-inflamatórias as quais são liberadas durante a resposta imune. Interferon- γ é um dos principais mediadores da sua transcrição e sua ativação aumenta a relação KYN/ Trp. Embora o Trp atravessasse facilmente a barreira hematoencefálica, os níveis de IDO são mais baixos no cérebro comparado com a periferia, assim cerca de 60% do metabolismo da KYN cerebral é iniciada pela penetração direta desse metabólito no cérebro

após ser sintetizada na periferia e absorvida pelos astrócitos e pelas células microgliais utilizando um transportador de aminoácido neutro (Fukui, Schwarcz et al. 1991).

Alterações na disponibilidade de Trp podem repercutir no metabolismo da KYN. A IDO é ativada durante a gestação atuando na imunotolerância fetal (Moffett and Namboodiri 2003; Schrocksnadel, Widner et al. 2003). Foi documentado que a redução da atividade de IDO na placenta e níveis elevados de Trp no plasma são encontradas em estados de pré-eclâmpsia (Kudo, Boyd et al. 2003). Restrição na quantidade de Trp na dieta reduz a síntese de KYN e repercute na patogênese da catarata em ratos (Raju, Kanth et al. 2007). A suplementação de Trp na dieta ajuda a preservar a homeostase desse aminoácido em porcos que sofrem de inflamação pulmonar (Le Floch N et al., 2008). Além disso, deficiência em Trp resulta em demência e pode afetar o estado imunológico controlado pela enzima IDO (Penberthy, W.T.) No estudo de Okuno A et al., (2011), a suplementação da dieta com Trp altera o metabolismo da KYN de forma a aumenta os níveis de ácido quinurênico (KA), metabólico da KYN que está diretamente relacionado a alterações cognitivas (Okuno, Fukuwatari et al. 2011).

Durante décadas o interesse nos produtos do metabolismo do Trp se teve centrado nas funções fisiológicas da 5-HT. No entanto, sabe-se que 90% de Trp degradado é convertido em KYN e menos de 5% de Trp ingerido seria usado para a síntese da 5-HT (Wolf and Hoffmann 1974; Stone and Darlington 2002). A KYN foi identificada nos primeiros anos do século 20 como fonte catabólica da vitamina B3 (ácido nicotínico ou niacina). Foi considerada apenas como uma via para a produção endógena dessa vitamina, com o objetivo de compensar qualquer deficiência dietética. Hoje ela é conhecida por desenvolver importantes funções tanto em nível periférico quanto sobre o sistema nervoso central.

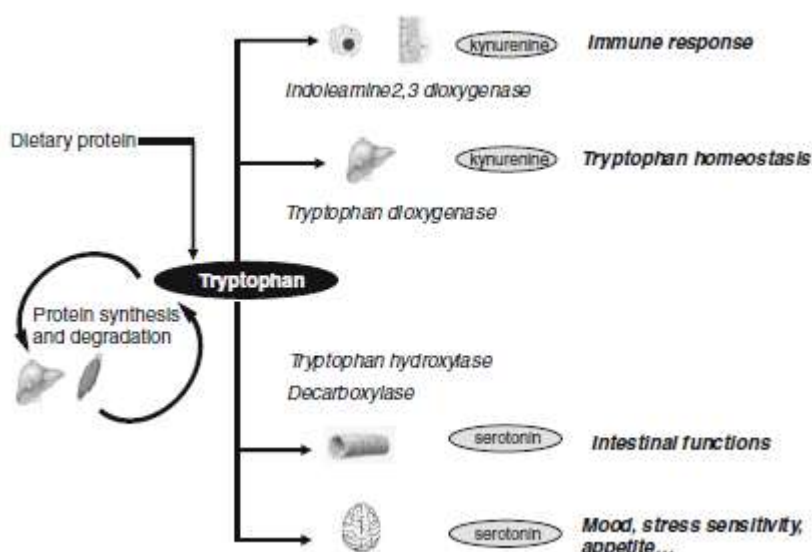


Figura 6. Esquema das diversas funções do triptofano em diferentes tecidos.

9.2.3.1 Metabolismo da quinurenina

A via metabólica da KYN é complexa. Ela é iniciada pela clivagem oxidativa do Trp pela enzima IDO ou TDO para produzir N-formilquinurenina e posterior síntese da molécula estável, KYN. O subsequente metabolismo da KYN segue três mecanismos: 1) Deaminação pela quinurenina amino-transferase (KAT), para produzir KA, 2) degradação pela quinureninase (KYNU) resultado na produção de ácido antranilínico (AA) e 3) Hidroxilação pela KMO para produção de 3-hidroxiquinurenina (3-HK). 3-HK é metabolizado pela KAT em ácido xanturênico (XA) ou convertido em ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HANA) pela enzima KYNU, em seguida, oxidado pela 3-hidroxi-antranilate 3,4 dioxigenase (3-HAO) em ácido 2-amino-3-carboximuconico 6-semialdeído (ACMS). Sob condições fisiológicas, este intermediário reagrupa-se espontaneamente para formar o ácido quinolínico (QA), o qual é subsequentemente transaminado pela fosforribosiltransferase quinolinate (QPRT) para gerar ácido nicotínico, e, finalmente Dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+) (Maddison, Giorgine, 2015). (Figura 7).

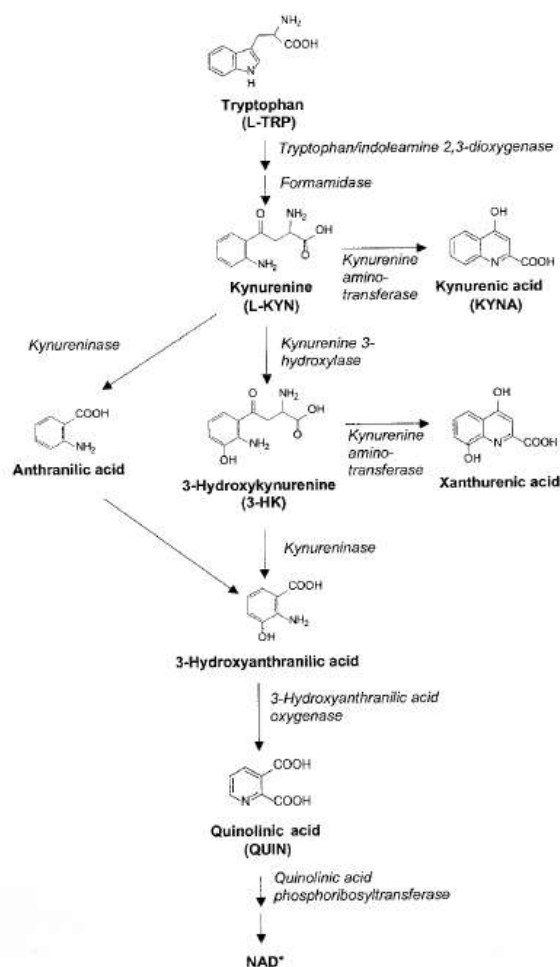


Figura 7. Síntese da via metabólica da quinurenina.

O papel fisiológico da via KYN foi inicialmente atribuído à formação da coenzima NAD⁺, que está envolvida em vários processos biológicos, tais como reações redoxes essenciais para a função mitocondrial e do metabolismo energético (Ying W, 2008). Estudos subsequentes demonstraram que os metabólitos intermediários produzidos pela via da KYN, conhecidos como quinureninas, desempenham importante papel em algumas funções fisiológicas tais como no comportamento, no sono, na termoregulação e na gestação (Curzon 1996, Stone et al. 1993). A via metabólica da quinurenina também é bastante relacionada à resposta inflamatória. Seus intermediários são capazes de induzir a expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores em astrócitos, promovendo inflamação (Guillemin, Smith et al. 2000). Além disso, nos últimos anos, esses compostos têm sido relacionados à fisiopatologia de várias doenças metabólicas e distúrbios cognitivos.

9.2.3.2 Quinureninas e desenvolvimento cerebral

Alguns estudos demonstram que a inibição perinatal da via da KYN com Ro61-8048, um inibidor seletivo da KMO, produz alterações na morfologia de neurônios hipocampus, na densidade sináptica e na localização imunocitoquímica de proteínas relacionadas ao desenvolvimento cerebral em filhotes com 60 dias (Khalil, Pizar et al. 2014). Além disso, a ativação do sistema imunológico devido a exposição perinatal a infecção viral pode seletivamente alterar a expressão de várias proteínas envolvidas nas fases precoces da neurogênese, orientação axonal e na formação de sinapses cerebral na prole de animais com 21 dias após o nascimento (Forrest, Khalil et al. 2012). As alterações observadas incluem diminuição da expressão da subunidade GluN1 dos receptores NMDAR, alterações em *morphogenetic protein sonic hedgehog* e nos níveis de α -synuclein, combinadas com um aumento da expressão da TPH (Forrest, Khalil et al. 2012).

Ratas gestantes foram tratadas no período perinatal com Ro61- 8048 e foi observado um substancial aumento (10x mais) nos níveis cerebrais de KA juntamente com a alteração da expressão de subunidades GluN2A e GluN2B no cérebro de embriões (Forrest, Khalil et al. 2013). Além disso, aos 21 dias de vida pós-natal, houve um aumento na densidade da proteína PSD-95 e nos níveis de *sonic hedgehog*, assim como aumento na expressão de *doublecortin* e do antígeno nuclear de células em proliferação (Forrest, Khalil et al. 2013). A quantidade total e a proporção entre diferentes subunidades dos receptores de glutamato são considerados críticos nas funções sinápticas, na plasticidade e na neurodegeneração (Hardingham and Bading, 2011).

Estudos posteriores corroboraram com esses achados (Pizar, Forrest et al. 2014). As alterações moleculares nos períodos precoces do desenvolvimento cerebral foram associadas ao aumento da excitabilidade neuronal no período pós-natal e LTP, fator que é considerado crítico em alguns aspectos da função cognitiva (Forrest et al., 2013). Uma ligação importante entre estas várias alterações e o comportamento foi indicado num estudo que mostra que a administração de KYN em ratos durante a adolescência podem levar a deficiências no comportamento social na idade adulta, enquanto um tratamento idêntico em adultos não apresenta tal efeito (Trecartin and Bucci 2011). O tratamento com KYN antes e

imediatamente após o nascimento produziu não só o aumento nos níveis de KA, mas também produziu disfunção cognitiva (alteração na atenção e memória) significativa na idade adulta (Pocivavsek et al., 2012; Alexander et al., 2013). O aprendizado e a memória parece também ser sensíveis ao tratamento com KYN durante a adolescência (Akagbosu, Evans et al. 2012) e na vida adulta (Chess, Landers et al. 2009). No estudo de Iaccarino et al. (2013) foi observado que ratos tratados com KYN entre os dias 7-10 pós-natal, apresentaram aumento dos metabólitos, KA e QA durante o tratamento e alteração no comportamento social e a atividade locomotora quando adultos (Iaccarino, Suckow et al. 2013).

Existe uma escassez de estudos que abordem alterações do metabolismo da KYN decorrente da desnutrição durante o desenvolvimento fetal. Até o presente momento, apenas um estudo teve como objetivo determinar se o metabolismo do Trp é afetado pela restrição do crescimento intrauterino de fetos expostos à desnutrição proteica materna (Sano, Ferchaud-Roucher et al. 2014). Os autores quantificaram as concentrações de Trp, KYN, 5-HT e QA no plasma e tecidos de fetos e mães nos períodos E13 e E20. Eles observaram que a concentração de 5-HT é reduzida nas mães podendo impactar sobre a secreção de insulina e assim alterar o metabolismo dos carboidratos. Além disso, a concentração de Trp a partir de diferentes fontes como plasma materno, plasma fetal e plasma umbilical foi menor, enquanto a concentração de QA foi duas vezes maior nos animais desnutridos em E20, podendo ser neurotóxico para o cérebro de rato. Os autores sugerem que tais alterações durante o desenvolvimento podem prejudicar a síntese de NAD em animais expostos a dieta materna pobre em proteína, conduzindo a mudanças epigenéticas as quais podem estar relacionadas ao aumento na susceptibilidade de doenças em bebês quando atingirem a idade adulta (Sano, Ferchaud-Roucher et al. 2014) e são consideradas atualmente como um conjunto de processos de expressão e transmissão da informação genética, incluindo a transmissão transgeracional.

9.2.4 Transmissão transgeracional da programação metabólica

Um elemento-chave da programação é a existência de efeitos transgeracionais, pela qual uma exposição a diversos fatores no início da vida pode afetar a saúde não só da primeira geração, mas também das gerações futuras. Vários estudos prospectivos fornecem evidências

convincentes de que a exposição materna pode ter efeitos permanentes sobre a saúde da prole que se perpetuam através das gerações (Heijmans et al. 2008). Um grande exemplo seria a segunda geração (F2) de descendentes da fome holandesa, na qual bebês, cujas avós maternas atravessaram um período de fome durante a gravidez, apresentavam um maior índice ponderal em comparação com os controles, dando provas de um efeito transgeracional (Painter, Osmond et al. 2008).

Os modelos de animais fornecem evidências da programação transgeracional sobre vários fenótipos de doenças. Torrens e colegas demonstraram que ratos expostos a baixo teor de proteína ao longo da gestação podem transmitir hipertensão e disfunção endotelial mesentérica na geração F2 (Torrens et al. 2008). Bertram et al. também investigaram os efeitos transgeracionais da restrição de nutrientes durante a gravidez em parâmetros cardiovasculares e função hipotálamo-hipófise-adrenal em animais (Bertram et al. 2008). Eles sugeriram que os descendentes machos de fêmeas F1 expostas à restrição alimentar precoce apresentavam hipertensão na idade adulta e maior espessura da parede do ventrículo esquerdo. Outros estudos relataram posteriormente o aumento da pressão arterial e o número reduzido de néfrons em duas gerações de ratos descendentes de mãe ou pai que foram expostos à restrição proteica no período pré-natal (Harrison and Langley-Evans, 2009). Nesse estudo, não foram observados efeitos sobre a geração F3, sugerindo que o insulto inicial tinha um impacto sobre o feto da geração F1 e as células germinativas que formam a geração F2. Transmissão de disfunção cardiovascular também foi observada num modelo de rato com pré-eclâmpsia, em que a redução da perfusão uterina resultou na elevação da pressão sanguínea e hiperresponsividade vasoconstritora em duas gerações subsequentes (Anderson et al. 2006).

Outros estudos também têm investigado o metabolismo alterado de glicose e insulina nos descendentes machos e fêmeas da geração F2 cujas avós foram expostas a baixos níveis de proteína durante a gestação (Zambrano et al. 2005). Além disso, em um estudo de restrição calórica materna, o baixo peso ao nascer foi transmitido para a geração F2 e esses descendentes desenvolveram prejuízos na tolerância à glicose e disfunção das células- β do pâncreas (Jimenez-Chillaron et al. 2009). Descendentes das gerações F2 e F3 do sexo masculino apresentaram peso do pâncreas reduzido em relação ao nascimento, com a redução do volume de ilhotas e massa de células β nos dias pós-natal 1 e 21 e foram

hiperinsulinêmicos no dia 21 (Frantz et al. 2011). Efeitos na geração F3 sugerem transmissão intergeracional de fatores de risco de doenças metabólicas através de outros mecanismos diferentes da exposição direta dos gametas. Estudos apoiam esses resultados, onde os efeitos no metabolismo da glicose foram estendidos para a geração F3 (Benyshek et al. 2006).

Além disso, os estudos tentam caracterizar o papel que ambas as vias, materna e paterna, desempenham um papel importante na transmissão transgeracional da programação. O grande estudo *British National Child Development* mostrou os efeitos da programação sobre o peso ao nascer na terceira geração (F3) sendo este transmitido pela via materna (Alberman et al. 1992), enquanto Kaati e colegas sugeriram a transmissão de doenças cardiovasculares e diabetes até a geração F2 de avôs que foram expostos à baixa disponibilidade de alimentos durante a sua infância (Kaati et al. 2002).

Objetivos

9.3 Objetivos

9.3.1 Objetivo geral

Estudar o impacto a curto e longo prazo da desnutrição proteica perinatal sobre o metabolismo do triptofano cerebral.

9.3.2 Objetivos específicos

- Efetuar uma análise quantitativa das vias metabólicas de triptofano no *forebrain* e *hindbrain* de embriões controles e desnutridos com 13 e 17 dias de vida intrauterina.
- Determinar o nível de expressão gênica das enzimas IDO, TPH2 e KMO no *forebrain* e *hindbrain* de embriões controles e desnutridos com 17 dias de vida intrauterina.
- Quantificar os metabólitos do triptofano no tronco cerebral, hipocampo e córtex pré-frontal de animais adultos controles e desnutridos da primeira geração.
- Determinar o nível de expressão gênica das enzimas IDO, TPH2 e KMO no córtex, tronco cerebral e hipocampo de animais adultos controles e desnutridos da primeira geração.
- Quantificar os metabólitos do triptofano no hipocampo e córtex pré-frontal de animais adultos controles e desnutridos da segunda geração.
- Traçar as características fenotípicas e o perfil metabólico dos animais adultos controles e desnutridos da segunda geração.

Materiais e Métodos

9.4 Materiais e métodos

9.4.1 Comitê de ética

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo “Comité d’éthique pour l’expérimentation animale, Pays de la Loire, France” sob o número 06 (March 20th, 2013; CEEA.2010.38) e pelo Comitê de Ética para Condução de Estudos em Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os estudos nos ratos foram realizados de acordo com as normas da unidade de experimentação animal de Nantes (em conformidade com o European Communities Directive de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC) e com os Princípios de cuidados a animais laboratoriais (NIH publication no. 85–23, revised 1985).

9.4.2 Animais e dietas

Para as avaliações realizadas foram utilizadas ratas Wistar-Han virgens, com idade de 60 dias e pesando 210 ± 20 g, provenientes do fornecedor Charles-River (França) e do Biotério de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas foram acasaladas com machos de mesma idade, linhagem e fornecedor. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, e ciclo claroescuro de 12/12 horas (claro das 07:00 às 19:00 h, escuro das 19:00 às 07:00 h), e livre acesso à água e dieta padrão de biotério (Ração SAFE® - A04, 18% proteína). O diagnóstico do estado de prenhez foi realizado através de esfregaço vaginal. Confirmada a gestação, as ratas passaram a receber as dietas experimentais dando origem a dois grupos: Controle (C), cujas ratas receberam dieta normoproteica (proteína à 17%) ou Desnutrido (PR – Protein Restricted), receberam dieta hipoproteica (proteína à 8%). As dietas eram isocalóricas, seguiam as recomendações da AIN-93G (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) e estão descritas na Tabela 1. Os regimes experimentais foram mantidos durante toda a gestação e lactação. Um dia após o nascimento, os filhotes foram pesados e selecionados, formando-se ninhadas com 8 filhotes e a mãe (5 machos e 3 fêmeas, quando possível). Após o desmame, todos os filhotes passaram a receber dieta de manutenção (Ração SAFE® - A04, 18% de proteína) e ficaram alojados em gaiolas com, no máximo, 4 animais.

Tabela 1. Ingredientes das dietas Controle e hipoproteica

Constituintes	Dieta Controle	Dieta Hipoprotéica
g%	100,00	100,00
Proteína (Caseína)	18,00	8,10
Carboidratos	65,20	75,10
Lipídios	7,00	7,00
Celulose	5,00	5,00
Vitaminas	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30
% Kcal	3,6 Kcal/g	3,6 Kcal/g

Todos os procedimentos realizados de acordo com o European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86 / 609 / EEC) em relação aos cuidados e uso de animais para procedimentos experimentais. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

9.4.3 Descrição das fases experimentais

9.4.3.1 Obtenção dos embriões

Ao 13° (G13) e ao 17° (G17) dia de gestação, ratas gestantes de cada grupo experimental (controle e desnutrido) foram anestesiadas com isoflurano 2%. A percentagem de isoflurano foi modulada de acordo com as reações do animal (ritmo e amplitude dos movimentos respiratórios e movimentos espontâneos). Os fetos de cada fêmea foram extraídos por cesariana. O cérebro de cada feto foi dissecado e dividido em *forebrain* e *hindbrain*. As mães foram sacrificadas por deslocamento cervical.

9.4.3.2 Obtenção dos animais adultos da primeira geração

Outro grupo de ratas gestantes foi alimentado *ad libitum* com a dieta controle ou hipoproteica durante toda gestação e lactação. Vinte quatro horas após o parto, os filhotes foram selecionados e randomizadas formando ninhadas com 8 filhotes numa relação de 1 para

1 entre machos e fêmeas. No desmame (21 dias), todos os machos controles e desnutridos foram alimentados com dieta padrão de laboratório. As fêmeas foram descartadas do estudo. Aos 210 dias de vida, parte desses animais foi sacrificada num ambiente enriquecido por CO₂, seguido de deslocamento cervical. O córtex, tronco cerebral e hipocampo foram dissecados e armazenados a -80° C até a análise. Outra parte desses animais foi utilizada para a obtenção dos animais da segunda geração.

9.4.3.2 Obtenção dos animais adultos da segunda geração

Para obtenção dos animais da segunda geração (F2), filhotes da primeira geração (F1) foram acasalados da seguinte forma: Animais do sexo feminino da geração F1 de cada grupo experimental (controle e desnutrido) foram acoplados com 8 semanas de idade com os animais do sexo masculino (controles) da geração F1, não da mesma mãe. Essas ratas gestantes foram submetidas às mesmas manipulações experimentais descritos na primeira etapa do protocolo, no entanto, todas elas foram alimentadas com uma dieta padrão durante a gestação e lactação. O peso corporal foi avaliado a cada 4 dias durante a lactação e a cada 7 dias após o desmame. Aos 180 dias de vida, foi realizada a análise do perfil metabólico e logo em seguida esses animais foram sacrificados num ambiente enriquecido por CO₂, seguido de deslocamento cervical. O córtex e hipocampo foram dissecados e armazenados a -80° C até a análise. O tecido adiposo foi retirado e pesado.

9.4.4 Experimentos

9.4.4.1 Cromatografia líquida – Espectometria de massa

A cromatografia foi realizada no AQUITY H-Class (Waters), utilizado a colônia Acquity UPLC HSS T3 2,1mmx100mm, 1,7 µm (Waters). A detecção do espectro de massa foi realizada utilizando oXévo TQD (Waters). As moléculas foram separadas utilizando uma fase móvel composta por H₂O + 0,5% ácido Fórmico + 2,5 mM acetato de amônia (Solvente A) e Acetonitrila + 0,5% ácido Formico + 2,5 mM acetato de amônia (Solvente B) a uma taxa de fluxo de 0,4 mL /min, atingindo pressões variando de 20 a 35 MPa . Utilizou-se um perfil de gradiente, começando com 99 % do Solvente A, mantendo esta composição

constante durante 6 minutos, em seguida, ela foi reduzida linearmente para 75 %. Esta composição foi realizada por mais 10 segundos, antes de retornar às condições iniciais por 1,40 min. O tempo total de execução total foi de 7,50 min. 2 µL foi injectado no sistema cromatográfico para análise. Os Parâmetros de ionização das moléculas analisadas encontram-se na Tabela 2. O triptofano $^{15}\text{N}_2$ foi utilizado como Estandarte interno. 50 mg de tecido foi triturado em 190 µL de H_2O + 2,7 mM EDTA + 1% AF + 10 mL de TrP $^{15}\text{N}_2$ a 50 mM. Após homogeneização foi adicionada 500 µL de acetonitrila gelada e centrifugado a 12000 RPM, durante 15 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi recuperado e deixado secar sobre um evaporador de nitrogênio por 30 Minutos. O Conteúdo restante foi suspenso em 100 µL de H_2O + 2,7 mM EDTA + 1% de AF.

Nome	Parents Ion(Pa)	Daughter Ion (Da)	Dwell (s)	Cône (V)	Collision (V)
Triptofano $^{15}\text{N}_2$	207,004	189,071	Auto	20	8
Triptofano	205,004	188,044	Auto	14	8
Serotonina	176,977	160,081	Auto	18	8
Ácido 5-hidroxiindolacético	191,957	146,061	Auto	26	14
Ácido quinurênico	189,883	144,047	Auto	30	18
Quinurenina	209,004	192,039	Auto	20	8
Acide quinolínico	167,904	150,026	Auto	20	8
Acide antralínico	137,853	120,028	Auto	16	10
Acide Xanturênico	205,947	160,048	Auto	30	18

Tabela 2 Parâmetros de ionização no modo positivo (ESI +) para o método espectrometria de massa.

9.4.4.2 Real-time quantitative reverse transcription-PCR

O tecido cerebral foi homogeneizado em reagente Trizol® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) para extração do RNA total. O RNA foi tratado com DNase (livre de RNases) por 30 minutos à 37° C e subsequentemente purificado por um kit de purificação de minicolumna NucleoSpin from Macherey-Nagel (Hoerd, France) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi checada em géis de agarose e a quantidade determinada usando o espectrofotômetro NanoVue™ Plus da GE Healthcare à 260 e 280 nm. Em seguida, 2mg do RNA purificado foi transcrito reversamente usando a Superscript II RNaseH- Reverse- Transcriptase (Invitrogen) em um volume total de 20mL e o DNAc resultante foi diluído 40 vezes em água livre de DNases e RNases. Então, 5mL de cada amostra de DNAc diluído foi utilizado como modelo para a amplificação de PCR utilizando SYBR Green (Biorad, Marnes la Coquette, France) como um corante fluorogênico e como sistema de detecção o iCycler iQ Real-Time PCR da BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Os parâmetros do PCR foram: uma desnaturação inicial de 5 minutos à 95° C seguida de 45 ciclos de 30s à 95° C e 30s à 60° C. As seqüências dos primers foram projetados usando as informações contidas no banco de dados público no GenBank, do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). The primers utilizados para amplificação foram: TPH2: Sense primer ATCCCAAGTTCGCTCAGTTTTCTC, Anti-sense Primer ACGCCCGCAGTTGACCTTC. IDO: Sense primer ATGGCGTATGTGTGGAAC Anti-sense Primer TCGTAAGACAGAATGGG, KOM: Sense primer GCTTCCAACGCATAGTGATG Anti-sense Primer GGCAGGCAACAGAAAGAAATC.

9.4.4.3 Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado aos 180 dias de vida dos animais da segunda geração. Após jejum de 16 horas, foi realizada a primeira coleta de sangue, denominando-se glicemia em jejum (tempo 0). Posteriormente, foi administrada glicose (dose de 1g/Kg de peso corporal) via gavagem e as outras amostras de sangue foram coletadas após 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 minutos. As concentrações de glicose sanguínea foram identificadas por leitura através de glicosímetro (AccuCheck Active).

9.4.4.4 Consumo de alimento hipercalórico

O consumo alimentar da dieta hipercalórica foi realizado aos 180 dias de vida e obtida pela diferença entre a quantidade ofertada e rejeitada na noite e o dia durante os dias consecutivos. A consumação relativa foi obtida dividindo a consumação alimentar (Kcal) dividida pelo peso corporal (g).

9.4.5 Análises de dados

Resultados experimentais são expressos em média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t-Student* ou two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. A significância estatística foi $p < 0,05$.

Resultados

9.5 Resultados

Os resultados oriundos desta tese são apresentados em forma de artigo e dados suplementares.

9.5.1 Artigo original

O artigo original pode ser encontrado a partir da página 85.

9.5.2 Resultados suplementares

Efeito da desnutrição protéica perinatal nas vias metabólicas do cérebro de animais de triptofano da segunda geração para a vida adulta

Não houve diferença significativa nos níveis de Trp, 5-HT, 5-HIAA, KYN, Ka e Qa no córtex (Figura 9a e 12c) e hipocampo (Figura 9b e 9c) entre animais controle e desnutrido da segunda geração.

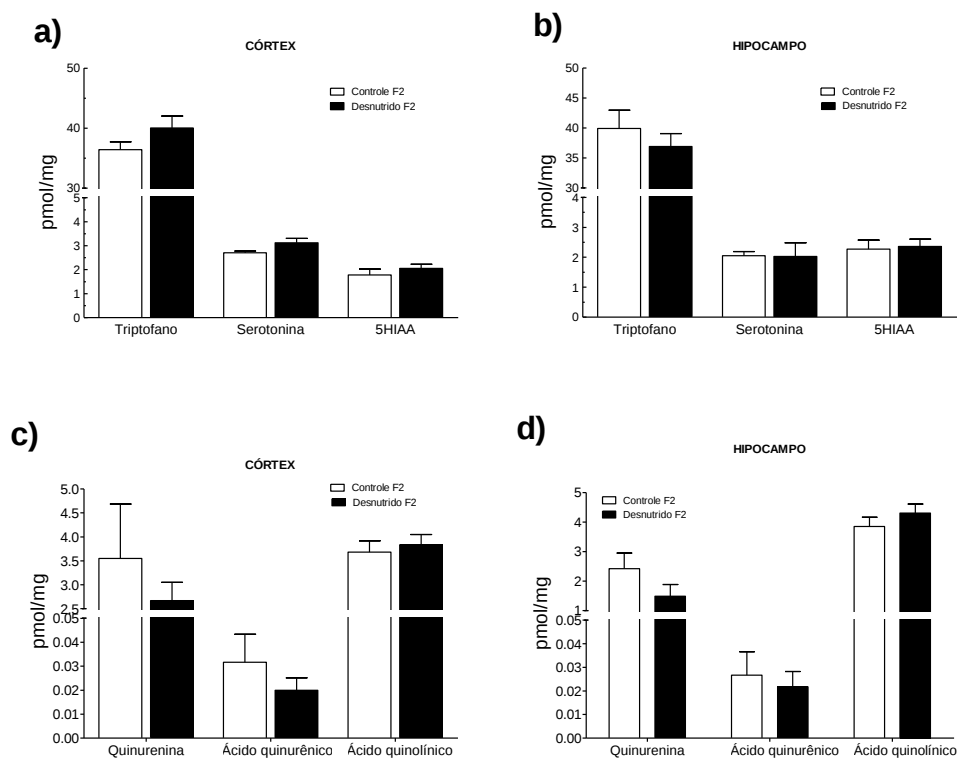


Figura 9. Análise quantitativa da via metabólica da serotonina a partir do triptofano no córtex (a), hipocampo (b) e via metabólica da quinurenina a partir do triptofano no córtex (c) e hipocampo (d) de animais da segunda geração. Os dados foram analisados pelo teste *t-student*.

Efeito da desnutrição protéica perinatal sobre o ganho de peso animal da primeira e segunda geração durante a lactação e após o desmame

Os animais desnutridos da geração F1 apresentaram um aumento no ganho de peso comparado ao grupo controle durante os nove primeiros dias de lactação (Controle, 200.20 ± 4.99 , $n=48$ versus desnutrido 168.32 ± 6.43 , $n=47$) (Figura 10a). Após o desmame, os animais desnutridos da geração F1 apresentaram um aumento no ganho de peso comparado ao grupo controle nos dois primeiros meses de vida (Controle, 550.25 ± 9.91 , $n=23$ versus desnutrido 645.75 ± 35.52 , $n=11$) (Figura 10b). Os animais desnutridos da geração F2 apresentaram um aumento no ganho de peso comparado ao grupo controle durante os nove primeiros dias de lactação (Controle, 190.70 ± 6.89 , $n=48$ versus desnutrido 228.66 ± 7.46 , $n=48$) (Figura 10c). Após o desmame, os animais desnutridos da geração F2 apresentaram um aumento no ganho de peso comparado ao grupo controle entre 60 e 100 dias de vida (Controle, 62.68 ± 1.830 , $n=25$ versus desnutrido 72.75 ± 3.230 , $n=17$) (Figura 10d).

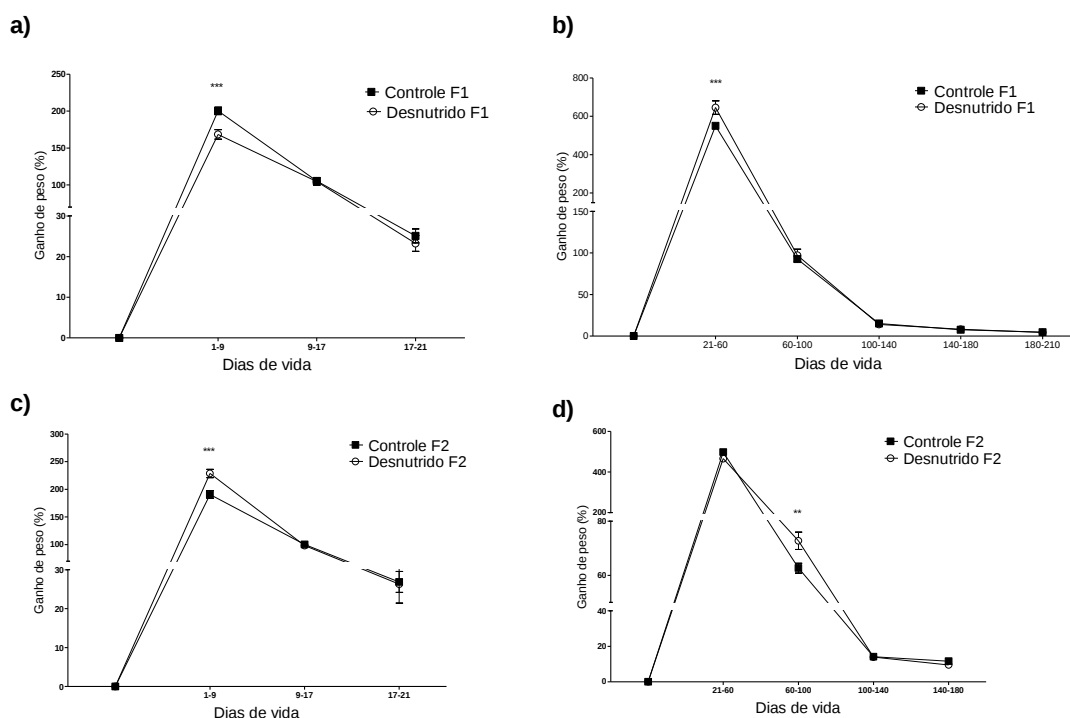


Figura 10. Ganho de peso dos animais da primeira geração durante a lactação (a) e após o desmame (b). Ganho de peso dos animais da segunda geração durante a lactação (c) e após o desmame (d). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Média $\pm$ SEM. ** P < 0,01 *** P < 0,001.

Efeito da desnutrição proteica perinatal caloria sobre o consumo de alimento hipercalórico e tecido adiposo dos animais da segunda geração.

Não houve diferença significativa no consumo alimentar entre os animais controles e desnutridos da segunda geração exposto a dieta hipercalórica durante 10 dias consecutivos de observação durante o dia (Figura 11a) e a noite (Figura 11b). O peso do tecido adiposo dos animais da geração F2 expostos à dieta hipercalórica foi maior comparado com o controle (controle, $28,05 \pm 3,06$, n=6 versus desnutrido $31,56 \pm 0,93$, n=5) (Figura 11c).

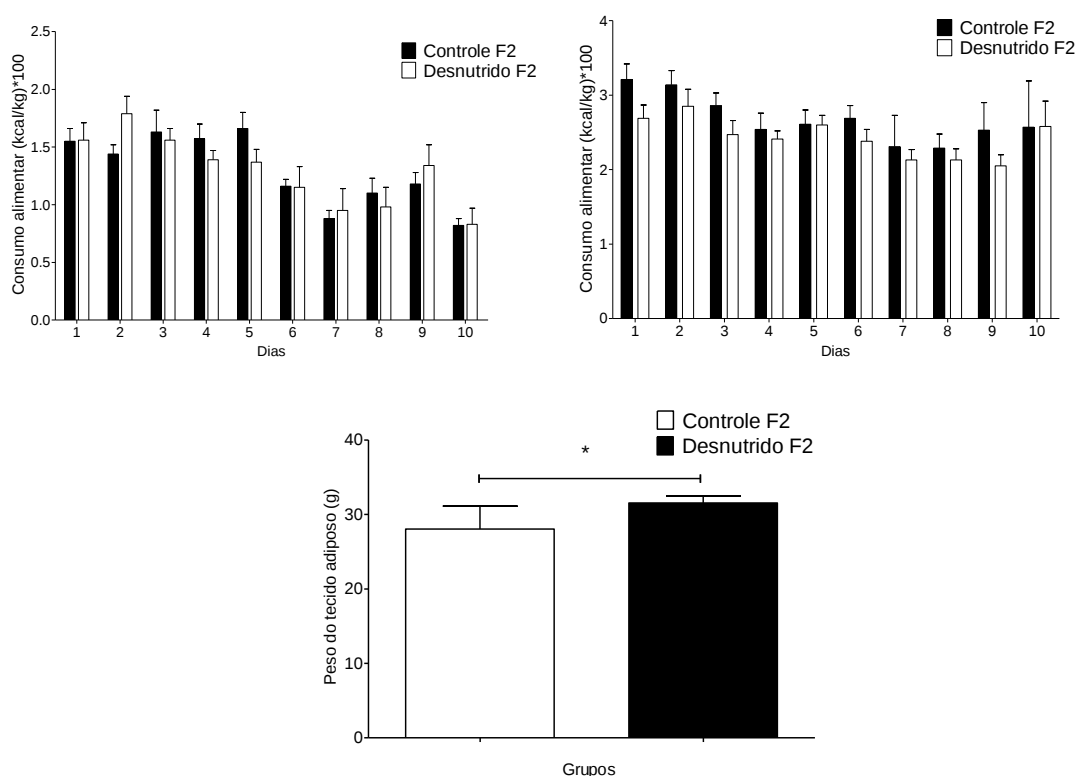


Figura 11. Consumo de alimento hipercalórico de animais da segunda geração durante 10 dias consecutivos de observação durante o dia (a) e a noite (b). Peso do tecido adiposo dos animais da geração F2 expostos à dieta hipercalórica (c). Os dados são expressos em (Kcal/kg de peso)x100. Média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido de Bonferroni test. Grupo controle, n=6 e grupo desnutrido, n=5.

Efeito da desnutrição protéica perinatal no peso corporal e perfil metabólico dos animais da primeira e segunda geração na idade adulta

Os animais desnutridos da geração F1 apresentaram menor peso corporal comparado ao grupo controle (controle, 664.40 ± 15.59 , $n=14$ versus desnutrido 586.7 ± 53.13 , $n=10$) (Figura 12a). Os animais desnutridos da geração F1 apresentaram menor quantidade de tecido adiposo comparados ao grupo controle (controle, 31.96 ± 1.989 , $n=15$ versus desnutrido 24.69 ± 2.135 , $n=11$) (Figura 12b). Não houve diferença estatística no teste de tolerância à glicose entre os animais da geração F1 (Figura 12c). Não houve diferença estatística no peso corporal entre os animais controle e desnutrido da geração F2 (Figura 12d). Os animais desnutridos da geração F2 apresentaram maior quantidade de tecido adiposo comparados ao grupo controle (controle, 20.97 ± 0.92 , $n=12$ versus desnutrido 29.59 ± 2.40 , $n=12$) (Figura 12e). Não houve diferença estatística no teste de tolerância à glicose entre os animais da geração F2 (Figura 12f).

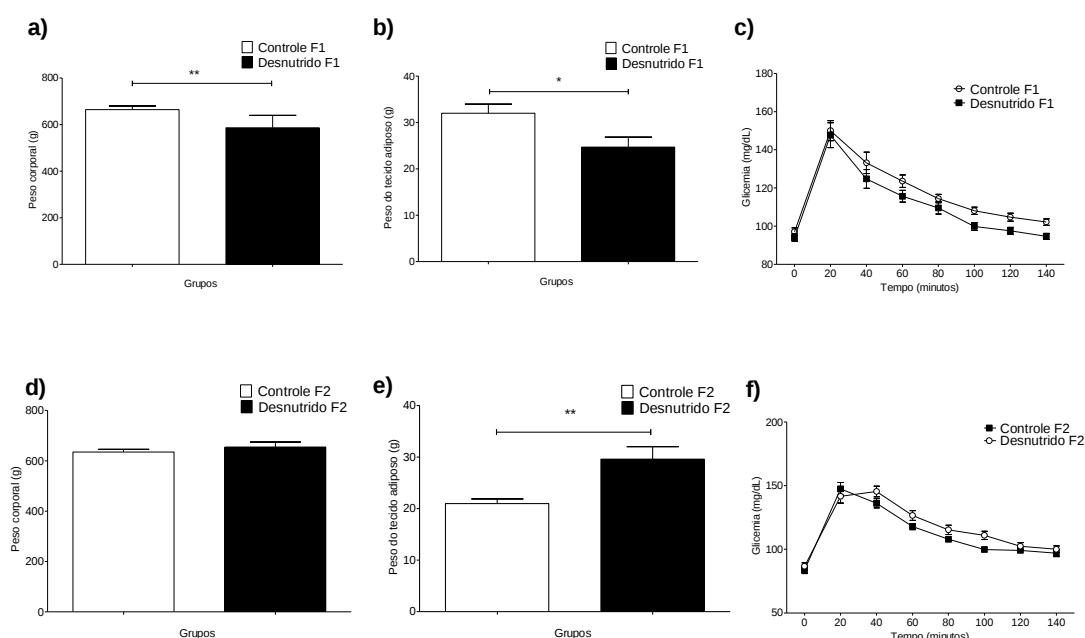


Figura 12. Peso absoluto em gramas dos animais da geração F1 (a). Peso do tecido adiposo dos animais da geração F1 (b). (c) Teste de tolerância à glicose dos animais da geração F1. Peso absoluto em gramas dos animais da geração F2 (d). Peso do tecido adiposo dos animais da geração F2 (e). Teste de tolerância à glicose dos animais da geração F2 (f). Os dados foram analisados por *Two-way ANOVA* seguido de *Bonferroni test* para o teste de tolerância à glicose e pelo teste *t-student* para avaliação do peso corporal e tecido adiposo. Os dados são expressos em Média $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$. * $P < 0,05$.

Discussão geral

9.6 Discussão geral

O presente estudo analisou o impacto a curto e longo prazo da desnutrição perinatal sobre o metabolismo do Trp cerebral. A desnutrição em nível experimental geralmente é induzida pela oferta de dietas com redução na concentração de nutrientes específicos, como por exemplo, baixas concentrações de proteína ou redução da quantidade de alimento oferecido caracterizado como restrição calórica. A manipulação da proteína recebe grande atenção devida sua importância plástica no crescimento e desenvolvimento e por ser o nutriente de difícil acesso devido seu custo.

O primeiro artigo desta tese teve como objetivo quantificar os produtos do metabolismo do Trp e a expressão das enzimas TPH2, IDO e KMO em cérebros de embriões e ratos adultos submetidos à desnutrição proteica perinatal. O segundo bloco de resultados, considerados como parciais, abordaram possíveis alterações transmitidas aos animais da segunda geração.

A desnutrição proteica perinatal alterou o metabolismo do Trp na fase embrionária do desenvolvimento cerebral, constatado pela redução na concentração de Trp, 5-HT e 5-HIAA no *forebrain* e *hindbrain* dos embriões analisados. Algumas hipóteses são levantadas para explicar nossos resultados. Sabe-se que aos 13 dias de vida IU, a única via de síntese de 5-HT para o *forebrain* fetal é em nível placentário a partir do Trp materno. Em nosso estudo foi visto que os níveis plasmáticos de Trp materno se encontram reduzidos em ratas que foram expostas a dieta pobre em proteína. Fernstrom JD. (1979) observou que dietas contendo 18 a 24% de caseína interferem nos níveis plasmáticos de Trp. Esse fato que pode ter contribuído para a redução nos níveis de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA nos embriões (Fernstrom, 1979).

No *hindbrain* aos 13 dias de vida IU a síntese de 5-HT parece não depender do Trp materno, pois nessa estrutura a 5-HT pode ser sintetizada pelo próprio embrião. Um fato que pode ter contribuído para a redução nos níveis de Trp, 5-HTP e 5-HIAA nos embriões G13 no *hindbrain*, é que apesar da não contribuição materna como fonte de 5-HT para o embrião, deve-se levar em consideração a influência da dieta pobre em proteína no embrião por si só. A falta de proteína pode prejudicar o transporte de Trp em nível cerebral, assim como a síntese

de 5-HT e consequentemente de 5-HIAA. O Trp é transportado por um transportador localizado nos capilares da barreira hematoencefálica. Esse transportador é compartilhado com os aminoácidos neutros como leucina, valina, isoleucina, os três aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), tirosina, fenilalanina e metionina. Consequentemente, a entrada do Trp no cérebro é influenciada pela relação entre o Trp com os aminoácidos que partilham o mesmo transportador que por ventura possa estar alterados nos animais experimentais (Pardridge, 1998).

Aos 17 dias de vida IU a desnutrição proteica materna não alterou os níveis de Trp cerebral dos embriões, porém reduziu a concentração de 5-HT no *forebrain* e *hindbrain* desses animais. Nesse período já existe a síntese de 5-HT em todo o cérebro do embrião, pois os axônios serotoninérgicos já são totalmente implantados (Lidov And Molliver, 1982; Aitken and Tork, 1988). Além da influência da dieta, outros fatores podem estar envolvidos nas alterações dos níveis de 5-HT independente da quantidade de Trp disponibilizado. O Trp se metaboliza em outras vias além da via serotoninérgica, como por exemplo, a via da melatonina e a via da Kyn, a qual é responsável por cerca de 90% do seu metabolismo. Uma alteração ao longo dessas outras vias pode ter um impacto importante nos níveis de 5-HT disponíveis. Além disso, estudos sugerem que modificações nos níveis de 5-HT podem estar relacionadas às alterações na atividade da enzima responsável pela sua síntese (Roberts and Fitzpatrick, 2013). Em nosso estudo, a desnutrição proteica reduziu a expressão gênica da enzima TPH2 no cérebro dos embriões aos 17 dias. Depleção de 5-HTP cerebral durante a embriogênese foi observado utilizando parachlorophenylalanine (PCPA), um inibidor da enzima TPH2 (Koe and Weissman, 1966; Ramos et al. 2002).

A grande relevância nos nossos achados se dá a partir do momento que levamos em consideração a importância do papel da 5-HT durante o processo de desenvolvimento cerebral e as consequências que a redução de sua concentração no cérebro pode causar. Como a 5-HT está, precocemente, mais presente no período de desenvolvimento do que outros sistemas de neurotransmissores e já que a taxa de utilização da 5-HT é mais elevada no cérebro de mamíferos imaturos do que em qualquer outro período (Hamon and Bourgoïn, 1979), é estabelecido que a 5-HT desempenha um papel fundamental em vários processo celulares durante o crescimento e maturação cerebral (Whitaker-Azmitia, 2001). Uma vez que os

terminais serotoninérgicos estão desenvolvidos em uma região alvo e seus receptores disponíveis, a liberação de 5-HT pode influenciar a neurogênese (Lauder and Krebs, 1976; Lauder and Krebs, 1978), a remoção neuronal, refinamento dendríticos, a migração de células, e plasticidade sináptica (Lauder, Wallace et al. 1981; Chubakov, Gromova et al. 1986; Lauder, 1990; Chubakov, Tsyganova et al. 1993). Na fase tardia do desenvolvimento, a 5-HT influencia o crescimento dendrítico. Ela altera o comprimento total de dendritos, a formação das espinhas dendríticas, e ramos no hipocampo e no córtex (Mazer, Muneyyirci et al. 1997; Faber and Haring, 1999).

Interessantemente, em nosso estudo os níveis da Kyn e a expressão gênica da enzima IDO se mantiveram preservadas nos cérebros dos embriões aos 13 e 17 dias de vida IU, evidenciando uma seletividade dos efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a via serotoninérgica. Estudos atuais vêm analisando o papel do metabolismo do TrP placentário via Kyn e sugerindo sua importância na manutenção e estabilização da imunotolerância materno-fetal evitando assim a rejeição do feto (Nishizawa et al. 2007; Sedlmayr et al. 2014). Em relação aos metabólitos da Kyn, a nutrição materna pobre em proteína reduziu os níveis de KA e aumentou os níveis de QA no cérebro dos embriões aos 13 e 17 dias de vida IU. O KA atua como um antagonista endógeno dos receptores $\alpha 7$ -NACH-R e dos receptores NMDA, enquanto o QA atua como agonista dos receptores NMDA (Maddison and Giorgini, 2015). Assim como a 5-HT, esses receptores estão criticamente envolvidos na plasticidade neural durante a embriogênese (Fagiolini et al. 2003; Iwasato et al., 2000). Eles desempenham papel fundamental na formação inicial e orientação de ramificações neuronais e no estabelecimento e estabilização sinápticas (Colonnese et al. 2005; Ultanir et al. 2007).

Estudos experimentais sugerem que bloqueando os receptores NMDA durante o período perinatal, provoca uma substancial perda das sinapses comparado com animais controle (Forrest et al. 2013). Além disso, o bloqueio do receptor de NMDA no período neonatal em ratos aumenta a apoptose neuronal, reduz o volume e número neuronal no hipocampo e altera a expressão do receptor de NMDA do hipocampo (Ikonomidou et al, 1999; Harris et al. 2003). Khalil et al (2014) observaram que o aumento no nível de KA produz alterações acentuadas na morfologia do hipocampo e na localização de proteínas imunocitoquímica em animais com 60 dias de vida. Por outro lado, já foi documentado que a

excessiva ativação desses receptores, causada pelo aumento de QA e concomitante redução de KA, resulta em excitotoxicidade, formação de radicais livres e perda de células nervosas, características compatíveis com doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (Sapko et al. 2006).

Em nosso estudo foi constatado por RT-PCR uma redução na expressão gênica da enzima KMO, o que não justifica a redução dos níveis de KA e aumento de QA cerebral. Segundo Zwilling et al. (2011), a inibição da enzima KMO reduz os níveis de QA e aumenta indiretamente os níveis de KA, melhorando processos neurodegenerativos. A via metabólica da Kyn, no cérebro, é complexa e por isso, fazem-se necessários estudos que investiguem outros aspectos moleculares da enzima KMO e ainda da KAT, enzima que converte diretamente Kyn em KA, podendo assim encontrar a justificativa da redução dos níveis de KA e o aumento de QA em organismos desnutridos durante o período perinatal (Zwilling et al. 2011).

Diante desses resultados e tendo conhecimento das funções dos metabólitos analisados no presente estudo, sugerimos que exista uma forte relação entre as alterações encontradas no metabolismo do Trp na fase embrionária e alterações cerebrais presentes em animais desnutridos na vida adulta. Estudos demonstram que a dieta hipoproteica durante os períodos críticos do desenvolvimento resulta na diminuição do peso do cérebro dos filhotes, particularmente no período pós-natal (de Souza, Fernandes et al.; Joshi, Shaikh et al. 2003; de Souza, Pacheco et al. 2008). Seus efeitos deletérios estão associados a uma sequência de eventos que se estende por todo o desenvolvimento do cérebro, incluindo a etapa da formação de células (neurogênese e gliogenesis), migração celular, e todos os aspectos de diferenciação, como a mielinização e sinaptogênese (Debassio, Kemper et al. 1994; Lukoyanov and Andrade 2000). Já foi documentado que a desnutrição perinatal interfere no tempo de desenvolvimento do giro denteado (Debassio, Kemper et al. 1994; Debassio, Kemper et al. 1996) e na morfologia das células do hipocampo (Diaz-Cintra, Cintra et al. 1991). Além disso, afeta a geração de células piramidais (Cintra, Diaz-Cintra et al. 1990; Serrano et al. 2002), induz redução na neurogênese das células granulosas (Debassio, Kemper et al. 1994; Debassio, Kemper et al. 1996) e altera o número de interneurônios GABA (Diaz-Cintra, Gonzalez-Maciél et al. 2007). O processo de migração neuronal também parece ser afetado, pois

alterações na proliferação celular pode modificar o tempo em que essas células chegam em seu local de destino, não recebendo seus estímulos adequadamente, o que pode produzir alterações neurofisiológicas (Morgane, Mokler et al. 2002).

Em paralelo aos resultados provenientes dos embriões, o presente estudo teve como objetivo analisar os metabólitos do Trp em estruturas cerebrais de animais adultos. Curiosamente, efeitos opostos foram observados. Sua repercussão em longo prazo foi evidenciada pelo aumento na concentração de Trp e 5-HT no córtex e tronco cerebral, assim como o aumento de 5-HT no hipocampo de animais adultos submetidos à desnutrição durante o período de gestação e lactação. Resnick, Morgane (1984) relataram elevações nas concentrações de Trp e 5-HT em regiões cerebrais analisadas por espectrofluorímetro, procedimento realizado do nascimento até aos 30 dias de vida em ratos de mães alimentadas com 6% de caseína. Deve notar-se que estas elevações são semelhantes às observadas em ratos submetidos à caseína 8% (Miller et al. 1977). Chen et al. 1992, demonstraram que, em ratos adultos, a desnutrição perinatal aumenta a liberação de 5-HT e 5-HIAA em hipocampo *in vitro* (Chen et al. 1992).

Para justificar o aumento desses metabólitos em nível cerebral, analisamos a expressão da TPH2, enzima responsável pela síntese de 5-HT a partir do Trp no cérebro. Foi observado que a desnutrição proteica materna reduziu os níveis de expressão da TPH2 no tronco cerebral de animais adultos, sendo assim, difícil justificar nossos achados a partir desse resultado. Manjarrez-Gutierrez et al. (2012) sugeriram que os ratos desnutridos durante o período perinatal apresentavam um aumento significativo na concentração de Trp, 5-HT e aumento da atividade da TPH1 e redução da atividade da TPH2 no tronco cerebral em relação aos controles durante a lactação. O número de neurônios imunorreativos que expressa TPH1 nos ratos desnutrição foi significativamente maior em comparação com a do grupo controle. O oposto foi observado em neurônios que expressam TPH2, que mostrou uma diminuição significativa na prole desnutrida. Estes resultados são interessantes porque foi relatado e aceito que a TPH1 aparece preferencialmente nos ratos adultos em diferentes órgãos periféricos em comparação com TPH2 que, inicialmente, foi pensado ser específica para neurônios serotoninérgicos localizados no tronco cerebral. Além disso, contrariamente a recentes pesquisas que relatam o aparecimento da TPH1 apenas no dia 22 (Nakamura et al.

2006; Nakamura and Hasegawa, 2007), foi observado a presença da TPH1 desde o nascimento. Esses resultados indicam fortemente a presença da TPH1 e possível atividade no cérebro pré-natal tendo um papel importante na síntese de 5-HT durante os períodos precoces do desenvolvimento. Sugere-se que a restrição proteica pode produzir alteração na expressão da TPH1 no tronco cerebral durante o desenvolvimento, contribuindo para o aumento dos níveis de 5-HT cerebral observado nesses animais. Em nossa pesquisa, não avaliamos o nível de expressão da TPH1, porém esse objetivo faz parte das nossas perspectivas.

As alterações na via metabólica da 5-HT parece estar relacionada aos vários déficits cognitivos e metabólicos apresentados por animais expostos à desnutrição precoce. Sabe-se que a 5-HT é envolvida em várias fisiológicas funções do corpo como, por exemplo, alimentação, emoção e cognição. Os estudos mostram que os efeitos comportamentais da 5-HT são mediados por vários tipos de receptores. O 5-HT_{1A} é um dos mais bem estudados devido à sua implicação nos comportamentos ligados a ansiedade (Heisler et al. 1998; Parks et al. 1998; Toth, 2003), na depressão (Lucki, 1991), bem como nos processos cognitivos que estão prejudicadas em vários transtornos psiquiátricos (Millan et al. 2012). O seu potencial papel como uma droga foi também investigado (Blier and Ward, 2003). Os receptores 5-HT₇ estão implicados na depressão, ansiedade, na aprendizagem e memória (revisado por Leopoldo et al. 2011).

Estudos experimentais demonstraram que ratos desnutridos durante o período de desenvolvimento exibiram alterações no comportamento social (Almeida, Tonkiss et al. 1996) e exploratório (Almeida, Tonkiss et al. 1996), além de déficits relacionados à memória (Castro and Rudy 1993; Cordoba, Arolfo et al. 1994). Fukuda e colaboradores (Fukuda, Francolin-Silva et al. 2002) demonstraram que os animais desnutridos no período de lactação até 49 dias pós-natal, tiveram dificuldade na consolidação das informações espaciais (aprendizado espacial) adquiridas durante a fase de treinamento de um teste chamado Labirinto Aquático de Morris (em inglês Morris water maze) (Redish and Touretzky 1998; de Hoz, Martin et al. 2004). Benton (Benton 2010) observou que deficiência de proteínas e ferro fetal e neonatal resulta em déficits de memória. Corroborando com esses dados, crianças expostas à desnutrição no período perinatal exibiam déficits cognitivos (Galler and Ramsey 1989; Walker, Grantham-Mcgregor et al. 2000), no aprendizado e memória (Tonkiss and

Galler 1990; Fukuda, Francolin-Silva et al. 2002), bem como susceptibilidade de desenvolver doenças psiquiátricas como a depressão (Brown et al. 2000; Costello, Worthman et al. 2007).

Respostas em longo prazo foram documentadas em animais aos 220 dias de vida cujas mães foram expostas à dieta pobre em proteína (caseína 6%) durante os períodos de gestação e lactação. Eles apresentaram aumento na liberação de 5-HT em tecidos do hipocampo (Chen, Tonkiss et al. 1992; Chen, Yoshida et al. 1995) e aumento na resposta da liberação de 5-HT após estimulação elétrica do núcleo medial da rafe (Mokler, Bronzino et al. 1999). Foi documentado que a administração do ansiolítico, clordiazepóxido benzo diazepino, em animais desnutridos, reduziu a liberação de 5-HT no hipocampo (Mokler, Galler et al. 2003). Os benzodiazepinos é conhecido por reduzir os níveis extracelulares de 5-HT em ratos estressados, sugerindo que a redução da liberação de 5-HT no hipocampo em ratos expostos à desnutrição proteica pré-natal pode estar associada com um aumento da resposta do animal ao estresse (Mokler, Galler et al. 2003). Em paralelo, ratos desnutridos durante a gestação apresentam um aumento dos níveis de 5-HT e 5-HIAA quando esses animais são expostos à separação materna após o nascimento, um modelo de estresse bastante utilizado nas pesquisas experimentais (Kehoe et al. 2001).

Estudos tiveram como objetivo estudar o efeito da fluoxetina (inibidor da receptação de 5-HT) sobre a agressividade de ratos adultos expostos à desnutrição durante o período de lactação. Foi demonstrado que a fluoxetina reduz a agressividade em animais controles, fato não observado nos animais desnutridos, sugerindo que o sistema serotoninérgico é afetado pela desnutrição durante os períodos críticos do desenvolvimento (Barreto-Medeiros, Feitoza et al. 2004). A fluoxetina também foi utilizada para avaliar o comportamento do sistema imune dos animais expostos à desnutrição durante o período de lactação. Foi demonstrado que a liberação de óxido nítrico na presença de fluoxetina é reduzida em macrófagos alveolares de animais desnutridos durante o período de desenvolvimento (Ferreira, Galvao et al. 2009). Também foi documentado que ratos desnutridos durante o período de gestação apresentam alteração no ciclo de sono-vigília e esse fato foi associado com as alterações encontradas nos níveis de 5-HT cerebral. As alterações do sono pode ter impacto no comportamento social e nas funções cognitivas desses animais (Datta and Hobson 2000).

Além disso, já está bem estabelecido que o 5-HT inibe a ingestão de alimentos através da sua interação com os receptores localizados no hipotálamo (Dalton et al, 2006). Assim, sugeriu-se que a restrição de proteína durante o desenvolvimento perinatal atenua a ação inibidora da 5-HT sobre a ingestão de alimentos por meio da redução de sensibilidade do receptor 5-HT1B e estes resultados são consistentes com a ideia de que as alterações adaptativas da sinalização da 5-HT se desenvolvem para compensar os altos níveis cerebrais de 5-HT induzidos pela desnutrição precoce (Lopes de Souza et al. 2008). Este fato, juntamente com a programação dos circuitos hipotalâmicos que regulam a homeostase energética, é um passo fundamental no desenvolvimento da hiperfagia e obesidade (Desai et al. 2007; Orozco-Solís et al. 2010).

Outro fato importante a ser considerado é que no presente estudo, a desnutrição proteica perinatal aumentou a concentração de Kyn no córtex e tronco cerebral dos animais analisados. Existe uma escassez de estudos que abordem alterações do metabolismo da Kyn decorrente da desnutrição durante o desenvolvimento fetal. Até o presente momento, apenas um estudo teve como objetivo quantificar as concentrações de metabólitos do Trp incluindo KYN e QA no plasma e tecidos de fetos e mães expostos à desnutrição proteica materna nos dias 13 e 20 de via IU (Sano, Ferchaud-Roucher et al. 2014). Os autores observaram que a concentração de QA foi duas vezes maior nos animais desnutridos no dia 20, podendo ser neurotóxico para o cérebro do rato.

Apesar da falta de estudos que relacionem a desnutrição perinatal com níveis de Kyn e seus metabólitos alterados, podemos fazer um paralelo com várias condições patológicas que estão relacionadas ao aumento nos níveis de KYN, assim como de seus intermediários. Foi observado em soro, no líquido céfalo-raquidiano (LCR) e/ou tecido cerebral de pacientes com diversas doenças que envolvem o sistema nervoso central as quais levam a extenso prejuízo cognitivo. As patologias associadas com o aumento da regulação da via de KYN incluem doenças infecciosas (HIV), doenças neurológicas (doença de Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica), perturbações afetivas (esquizofrenia, depressão e ansiedade) e doenças autoimunes (esclerose múltipla e artrite reumatoide). Todas essas patologias se caracterizam por apresentarem, no curso do seu desenvolvimento, distúrbios nos processos cognitivos, como: alterações na percepção, atenção, memória, raciocínio,

pensamento e linguagem (Guillemin, 2002; Guillemin, 2005; Bruijn Li et al. 2004; Beal, Matson et al. 1990; Zamanakou, Germenis et al. 2007).

Estudos experimentais demonstraram que os ratos foram tratados com 100 mg / kg de Kyn, o que resulta num aumento 3-4 vezes na concentração KA (Erhardt et al. 2004), consistente com o aumento observado em pessoas com esquizofrenia (Erhardt et al. 2001), produz déficits no comportamento social, na memória espacial e déficit de atenção (Chess et al. 2007, 2009; Trecartin KV and DJ Bucci, 2011). Os nossos dados indicam que um nível elevado da Kyn não conseguiu aumentar significativamente os níveis de KA. Portanto, esta é uma questão que deve ser abordada em estudos futuros.

Em nível metabólico, os estudos demonstram que níveis plasmáticos de KYN em tecidos adiposos e no fígado foram maiores em mulheres obesas do que em mulheres magras (Wolowczuk, Hennart et al. 2012). KYN e marcadores inflamatórios, incluindo a proteína C-reativa se encontram elevados em indivíduos obesos mórbidos (Brandacher, Hoeller et al. 2007). Foi observado também que a proporção Trp/KYN é significativamente aumentada em pacientes obesos em comparação com o grupo controle e não se normaliza após redução de peso.

A partir das alterações encontradas no metabolismo cerebral do Trp nos animais que foram expostos a dieta pobre em proteína durante o período de desenvolvimento surgiu o interesse de estender a pesquisa e investigar se essas alterações poderiam ser transmitidas para animais de segunda geração. Atualmente, um elemento-chave da programação é a existência de efeitos transgeracionais, pela qual uma exposição materna à diversos fatores no início da vida pode afetar a saúde não só da primeira geração, mas também das gerações futuras. Um dos fatores que poderiam explicar os efeitos transgeracionais seria a herança epigenética. Nutrição, por exemplo, pode induzir, em alguns locis, alterações epigenética que podem ser transmitidas às outras gerações afetando assim, a saúde dos descendentes. Hoje, a resposta transgeracional da nutrição é considerada a principal influência sobre a longevidade.

Vários estudos prospectivos fornecem evidências convincentes de que a exposição materna pode ter efeitos permanentes sobre a saúde da prole que se perpetuam através das gerações (Heijmans et al. 2008). Um grande exemplo seria a geração F2 de descendentes da

fome holandesa, na qual bebês, cujas avós maternas atravessaram um período de fome durante a gravidez, apresentavam um maior índice ponderal em comparação com os controles, dando provas de um efeito transgeracional (Painter, Osmond et al. 2008).

Sabe-se que ambas as vias, materna e paterna, desempenham um papel importante na transmissão transgeracional da programação, porém um maior número de estudos demonstraram efeitos de programação transgeracionais transmitidos através da via materna (Pinto and Shetty, 1995; Lam et al. 2000; Pinheiro et al. 2008; Peixoto-Silva et al. 2011; Nascimento et al. 2012). Para alcançar tal objetivo, acasalamos ratas que foram desnutridas durante o período perinatal com ratos controles da geração F1.

Claramente, nossos resultados não suportam a hipótese levantada sobre a transferência transgeracional das alterações do metabolismo do Trp encontradas na geração F1 (Figura 9). Porém deve-se levar em consideração que nossos resultados são parciais e que outras vias metabólicas do Trp, incluindo o estudo molecular das enzimas participantes, devem ser realizadas para uma conclusão mais consolidada sobre o tema. Apesar disso, levando em consideração o efeito transgeracional da programação metabólica já consolidada na literatura, pensamos em fazer um paralelo nas características fenotípicas encontradas entre a geração F1 e F2. Resultados interessantes foram encontrados.

Observamos que a desnutrição perinatal exposta aos animais da geração F1 aumentou o ganho de peso (catch-up) durante os nove primeiros dias de lactação e nos dois primeiros meses de vida (Figure 10a et 10b). Interessantemente, o mesmo evento foi observado nos animais da geração F2, evidenciando um efeito transgeracional das características fenotípicas desses animais (Figure 10c et 10d). Nossos resultados corroboram também com o ganho de peso observado em animais de primeira geração proposto por da Silva Aragão et al. (2014). Segundo os autores, esses animais apresentaram um maior ganho de peso durante os dois primeiros meses de vida pós-natal. Os estudos demonstram que o catch-up pode ser um ponto-chave para a programação da obesidade na vida adulta (Bieswal, 2006). Já está estabelecido de que após um período de restrição de nutrientes os seres humanos e outras espécies de mamíferos apresentam uma taxa mais rápida de crescimento durante a fase de reabilitação nutricional do que os outros indivíduos mantidos em nutrição adequada

(MacLean and Graham, 1980). Este fenômeno de crescimento compensatório está associado com hiperfagia e corresponde a um mecanismo de funcionamento homeostático para acelerar a restauração do peso corporal. Além disso, há evidências consideráveis de que o crescimento compensatório leva a uma mais rápida reposição de reservas de gordura do que a reconstituição da massa corporal magra (Dulloo and Girardier, 1990).

Na idade adulta, os animais desnutridos da geração F1 apresentaram redução na quantidade de tecido adiposo absoluto, acompanhado com a redução de peso corporal quando comparado ao grupo controle (figura 12a et 12b). Nossos resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram nenhuma alteração ou redução no acúmulo de gordura corporal após desnutrição proteica materna (Bieswalet al. 2006; Fagundes et al. 2007; Da Silva Aragão et al. 2014). Em contrapartida, esses resultados diferem de outros estudos onde a desnutrição proteica perinatal predispõe ao surgimento de dislipidemias e excesso de tecido adiposo (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009). Estas discrepâncias podem ser explicadas pela diferença no tempo e/ou intensidade de restrição nutricional, bem como pelos diferentes métodos utilizados para estimar a adiposidade do corpo. Além disso, alguns estudos sugerem que a quantidade de alimentos consumidos pela mãe durante o período gestacional pode ter um impacto significativo no desenvolvimento do tecido adiposo no feto (Parsons et al. 2001). Em relação aos animais de segunda geração, foi observada uma maior quantidade de tecido adiposo nos animais desnutridos, tanto sob regime alimentar padrão, ou quando expostos a dieta hipercalórica (figura 12e et 11c). Pinheiros et al. (2008) observaram aumento de tecido adiposo em animais de segunda geração descendentes daqueles que foram expostos a dieta pobre em proteína durante a gestação e lactação. Os autores atribuíram esse resultado às alterações encontradas nos níveis de leptina desses animais (Pinheiros et al. 2008). Leptina derivada do tecido adiposo é fundamental no controle central de apetite e balanço energético (Kershaw and Flier, 2004).

Várias investigações indicam, ainda, que o catch-up está associado à diminuição do gasto energético e que a deposição de gordura corporal é elevada, mesmo na ausência de aumento da ingestão de alimentos (Ozelci et al. 1978; Dulloo et al. 1993; Crescenzo et al. 2003). Com base nesta observação e nos resultados de estudos anteriores mostrando que a prole de mães alimentadas com uma dieta pobre em proteína durante o desenvolvimento

apresentam hiperfagia e preferência por alimentos ricos em açúcar e gordura, nós hipotetizamos que essa característica poderiam ser transmitidas para a segunda geração. Como visto em nossos resultados, não foi possível comprovar essa hipótese, pois não houve diferença significativa no consumo de dieta hipercalórica entre os animais controles e desnutridos da segunda geração durante 10 dias consecutivos de observação (Figura 11a e 11b). Um fato a ser discutido é a idade que esses animais foram analisados, pois observa-se que a hiperfagia apresentada por animais que foram submetidos à desnutrição proteica no período perinatal aparece durante as primeiras seis semanas após o desmame. Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi observado que animais exposto à dieta pobre em proteína durante o período perinatal apresentam aumento no consumo de dieta padrão os 35 dias de vida, porém essa característica desaparece aos 180 dias (Orozco-Sólis et al. 2009). Além disso, ainda aos 180 dias, a quantidade de comida rica em gordura ingerida pelos animais controles foi significativamente maior do que a quantidade de alimentos consumidos sob as mesmas condições experimentais pelos ratos desnutridos (Orozco-Sólis et al. 2009).

Tem sido sugerido que as alterações no comportamento alimentar associado com a desnutrição perinatal em animais jovens podem ser provocadas por uma desorganização anatômica dos núcleos hipotalâmicos que regulam a ingestão de alimentos (Plagemann et al. 2000; Yura et al. 2005). Outro mecanismo que foi proposto na tentativa de justificar a hiperfagia induzida pela programação fetal é uma alteração nos níveis de expressão de vários neurotransmissores e peptídeos que modulam a alimentação, tais como o neuropeptídio Y (Plagemann et al. 2000; Ikenasio- Thorpe et al. 2007), colecistoquinina (Plagemann et al. 1999) e proteína relacionada ao agouti (Ikenasio-Thorpe et al. 2007). Mais estudos são necessários para aprofundar os conhecimentos em relação ao comportamento alimentar de descendentes de segunda geração de animais que foram expostos a desnutrição durante o período perinatal.

Não houve diferença no teste de tolerância a glicose entre os animais controle e desnutridos da geração F1 (figura 12c). Nossos resultados corroboram com estudos onde foi sugerido valores normais na concentração de glicose ou hipoglicemia em animais expostos a desnutrição proteica perinatal quando comparado com animais controles (Fagundes et al. 2007; Silva Aragão et al. 2014). A idade dos animais experimentais parece ter influência

importante nos resultados. Ozanne e colegas também observou que os filhotes de mães desnutridas apresentavam melhor resposta à glicose e sensibilidade à insulina apenas quando jovens (Ozanne et al. 1996). Na nossa pesquisa, não houve diferença no teste de tolerância a glicose entre os animais controle e desnutridos da geração F2 (figura 12f). Pinheiros et al. 2008 observaram que a restrição proteica materna em fêmeas F0 durante a gestação e/ou lactação tiveram um efeito hiperglicemiante sobre os animais da geração F1e F2. Os resultados apresentados por Pinheiros et al., divergem dos resultados do presente estudo, porém deve-se considerar que a dieta utilizada por Pinheiros et al. difere da utilizada no presente estudo e além disso, a geração F1 já apresentava um fenótipo hiperglicêmico, diferentemente da presente pesquisa (Pinheiros et al. 2008).

Em conclusão, os resultados da tese sugerem que a desnutrição perinatal induz mudanças seletivas no metabolismo cerebral do Trp que persistem ao longo da vida, porém não são transmitidas à segunda geração. Dada a função reguladora chave da 5-HT e dos metabólitos derivados da quinurenina sobre o metabolismo energético e nos processos relacionados a cognição, sugere-se que essas modificações podem contribuir para o desenvolvimento de alterações cognitivas e metabólicas tipicamente observadas em indivíduos que foram desnutridos durante o período perinatal.

Perspectivas

9.8 Perspectivas

- Estudos da expressão gênica das enzimas TPH1 e KAT, no cérebro de animais cujas mães foram desnutridas durante a gestação e lactação;
- Estudos de alterações epigenéticas induzidas pela desnutrição materna sobre as enzimas TPH2, IDO e KMO no cérebro de animais desnutridos no período perinatal;
- Estudo da expressão gênica e as alterações epigenéticas das enzimas relacionadas ao metabolismo do Trp no cérebro de animais de segunda geração;
- Estudos comportamentais, com manipulação dos metabólitos do Trp, que abordem aspectos cognitivos de animais cujas mães foram desnutridas no período perinatal e animais de segunda geração.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- Aasheim, E. T. and T. Bohmer (2008). "Low preoperative vitamin levels in morbidly obese patients: a role of systemic inflammation?" *Surg Obes Relat Dis* **4**(6): 779-80.
- Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:894–903.
- Ahokas RA, Reynolds SL, Anderson GD, Lipshitz J. Maternal organ distribution of cardiac output in the diet-restricted pregnant rat. *J Nutr* 1984;12:2262–2268.
- Aihie Sayer, A., R. Dunn, et al. (2001). "Prenatal exposure to a maternal low protein diet shortens life span in rats." *Gerontology* **47**(1): 9-14.
- Aiken CE, Cindrova-Davies T, Johnson MH. Variations in mouse mitochondrial DNA copy number from fertilization to birth are associated with oxidative stress. *Reprod Biomed Online* 2008;6:806–813.
- Aitken, A. R.; Tork, I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J. Comp. Neurol.* v.274, p.32–47. 1988.
- Akagbosu, C. O., G. C. Evans, et al. (2012). "Exposure to kynurenic acid during adolescence produces memory deficits in adulthood." *Schizophr Bull* **38**(4): 769-78.
- Alberman E, Emanuel I, Filakti H, Evans SJ (1992) The contrasting effects of parental birthweight and gestational age on the birthweight of offspring. *Paediatr Perinat Epidemiol* **6**:134–144
- Alexander KS, Wu H-Q, Schwarcz R, Bruno JP (2012). Acute elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility: normalization by the alpha7 positive modulator galantamine. *Psychopharmacology* (Berl) **220**: 627–637.
- Almeida, S. S., J. Tonkiss, et al. (1996). "Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system." *Neurosci Biobehav Rev* **20**(3): 389-402.
- Almeida, S. S., J. Tonkiss, et al. (1996a). "Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats." *Physiol Behav* **60**(1): 197-201.
- Almeida, S. S., J. Tonkiss, et al. (1996b). "Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test." *Physiol Behav* **60**(2): 675-80.
- Amer, A., J. Breu, et al. (2004). "5-Hydroxy-L-tryptophan suppresses food intake in food-deprived and stressed rats." *Pharmacol Biochem Behav* **77**(1): 137-43.
- Anderson CM, Lopez F, Zimmer A, Benoit JN (2006) Placental insufficiency leads to developmental hypertension and mesenteric artery dysfunction in two generations of Sprague-Dawley rat offspring. *Biol Reprod* **74**:538–544
- Andrade, J. P., A. J. Castanheira-Vale, et al. (1996). "The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study." *Exp Brain Res* **109**(3): 419-33.
- Armitage JA, Ishibashi A, Balachandran AA, Jensen RI, Poston L, Taylor PD. Programmed aortic dysfunction and reduced Na⁺, K⁺-ATPase activity present in first generation offspring of lard-fed rats does not persist to the second generation. *Exp Physiol* 2007;3:583–589.
- Azmitia, E. C. (2001). "Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis." *Brain Res Bull* **56**(5): 413-24.

- Azmitia, E. C., A. M. Buchan, et al. (1978). "Structural and functional restoration by collateral sprouting of hippocampal 5-HT axons." *Nature* **274**(5669): 374-6.
- Baran, H, Staniek, K, Kepplinger, B, Stur, J, Draxler, M, Nohl, H. (2003) Kynurenines and the respiratory parameters on rat heart mitochondria. *Life Sci* **72**(10): 1103-15.
- Bar-Peled, O., R. Gross-Isseroff, et al. (1991a). "Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors." *Neurosci Lett* **127**(2): 173-6.
- Barker, D. J. (1995). "Intrauterine programming of adult disease." *Mol Med Today* **1**(9): 418-23.
- Barker, D. J. and C. Osmond (1988). "Low birth weight and hypertension." *BMJ* **297**(6641): 134-5.
- Barker, D. J., P. D. Winter, et al. (1989). "Weight in infancy and death from ischaemic heart disease." *Lancet* **2**(8663): 577-80.
- Barreto-Medeiros, J. M., E. G. Feitoza, et al. (2004). "Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats." *Nutr Neurosci* **7**(1): 49-52.
- Bast T, Zhang WN, Feldon J. (2003) Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus*.13:657–675.
- Bateson, P., D. Barker, et al. (2004). "Developmental plasticity and human health." *Nature* **430**(6998): 419-21.
- Beal, M. F., R. J. Ferrante, et al. (1991). "Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease." *J Neurosci* **11**(6): 1649-59.
- Beal, M. F., W. R. Matson, et al. (1990). "Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid." *J Neurochem* **55**(4): 1327-39.
- Behan, M. and L. B. Haberly (1999). "Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat." *J Comp Neurol* **408**(4): 532-48.
- Belladonna, M. L., U. Grohmann, et al. (2006). "Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO." *J Immunol* **177**(1): 130-7.
- Bellinger, L. and S. C. Langley-Evans (2005). "Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat." *Clin Sci (Lond)*. **109**(4): 413-20.
- Bellinger, L., C. Lilley, et al. (2004). "Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat." *Br J Nutr* **92**(3): 513-20.
- Bellinger, L., D. V. Sculley, et al. (2006). "Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats." *Int J Obes (Lond)* **30**(5): 729-38.
- Benes, F. M., J. B. Taylor, et al. (2000). "Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology." *Cereb Cortex* **10**(10): 1014-27.
- Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia* 2006;5:1117–1119.
- Benton, D. (2010). "The influence of dietary status on the cognitive performance of children." *Mol Nutr Food Res* **54**(4): 457-70.

- Bertram, C. E. and M. A. Hanson (2001). "Animal models and programming of the metabolic syndrome." Br Med Bull **60**: 103-21.
- Bertram C, Khan O, Ohri S, Phillips DI, Matthews SG, Hanson MA (2008) Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function. J Physiol 586:2217–2229
- Bettiol, H., D. Sabbag Filho, et al. (2007). "Do intrauterine growth restriction and overweight at primary school age increase the risk of elevated body mass index in young adults?" Braz J Med Biol Res **40**(9): 1237-43.
- Bieswal, F., Ahn, M. T., Reusens, B. et al. (2006) The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. Obesity 14, 1330–1343
- Bilhartz TD, Bilhartz PA, Bilhartz TN, Bilhartz RD. Making use of a natural stress test: pregnancy and cardiovascular risk. J Womens Health (Larchmt) 2011;5:695–701.
- Bjork JM, Dougherty DM, Moeller FG, Swann AC (2000) Differential behavioural effects of plasma tryptophan depletion and loading in aggressive and nonaggressive men. Neuropsychopharmacology 22:357–369
- Blatt, J.C. Chen, D.L. Rosene, L. Volicer, J.R. Galler, (1994). Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study, Brain Res. Bull. 34. 507–518.
- Blier, P., and Ward, N.M. (2003). Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? Biol. Psychiatry 53, 193–203.
- Blondeau B, Avril I, Duchene B, Breant B. Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. Diabetologia 2002;3:394–401.
- Blokland, A., C. Lieben, et al. (2002). "Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat." J Psychopharmacol **16**(1): 39-49.
- Bonnin, A. and P. Levitt (2011). "Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain." Neuroscience **197**: 1-7.
- Brandacher, G., E. Hoeller, et al. (2007). "Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player?" Curr Drug Metab **8**(3): 289-95.
- Brandacher, G., C. Winkler, et al. (2006). "Bariatric surgery cannot prevent tryptophan depletion due to chronic immune activation in morbidly obese patients." Obes Surg **16**(5): 541-8.
- Brawley L, Torrens C, Anthony FW, Itoh S, Wheeler T, Jackson AA, Clough GF, Poston L, Hanson MA. Glycine rectifies vascular dysfunction induced by dietary protein imbalance during pregnancy. J Physiol 2004;554(Pt 2):497–504.
- Brenner, B. M. and G. M. Chertow (1993). "Congenital oligonephropathy: an inborn cause of adult hypertension and progressive renal injury?" Curr Opin Nephrol Hypertens **2**(5): 691-5.
- Broday L, Peng W, Kuo MH, Salnikow K, Zoroddu M, Costa M. Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation. Cancer Res 2000;2:238–241.
- Brons, C., S. Jacobsen, et al. (2012). "Effects of high-fat overfeeding on mitochondrial function, glucose and fat metabolism, and adipokine levels in low-birth-weight subjects." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(1): E43-51.

- Brown, A. S., J. van Os, et al. (2000). "Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder." *Am J Psychiatry* **157**(2): 190-5.
- Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27:723–49.
- Burns, S. P., M. Desai, et al. (1997). "Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation." *J Clin Invest* **100**(7): 1768-74.
- Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007;3:435–439.
- Burdge GC, Hoile SP, Uller T, Thomas NA, Gluckman PD, Hanson MA, Lillycrop KA. Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. *PLoS One* 2011;11:e28282. Campbell, D. M., M. H. Hall, et al. (1996). "Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later." *Br J Obstet Gynaecol* **103**(3): 273-80.
- Carpenedo, R., A. Pittaluga, et al. (2001). "Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release." *Eur J Neurosci* **13**(11): 2141-7.
- Carpenedo R, Chiarugi A, Russi P, et al. (1994) Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuro Science*.61:237–43.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010;7:1084–1096.
- Castro, C. A. and J. W. Rudy (1993). "Impaired short-term memory resulting from postnatal undernutrition is attenuated by physostigmine." *Behav Neural Biol* **60**(3): 282-5.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* 2006;6:2909–2915.
- Chen, J. C., J. Tonkiss, et al. (1992). "Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus." *J Nutr* **122**(11): 2138-43.
- Chen, Z. L., S. Yoshida, et al. (1995). "Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus." *J Neurosci* **15**(7 Pt 2): 5088-97.
- Chess AC, Bucci DJ (2006). Increased concentration of cerebral kynurenic acid alters stimulus processing and conditioned responding. *Behav Brain Res* 170: 326–332.
- Chess, A. C., A. M. Landers, et al. (2009). "L-kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning." *Behav Brain Res* **201**(2): 325-31.
- Chess, A. C., M. K. Simoni, et al. (2007). "Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits." *Schizophr Bull* **33**(3): 797-804.
- Chubakov, A. R., E. A. Gromova, et al. (1986). "Effect of serotonin on the development of a rat cerebral cortex tissue culture." *Neurosci Behav Physiol* **16**(6): 490-7.
- Chubakov, A. R., V. G. Tsyganova, et al. (1993). "The stimulating influence of the raphe nuclei on the morphofunctional development of the hippocampus during their combined cultivation." *Neurosci Behav Physiol* **23**(3): 271-6.

- Cintra, L., S. Diaz-Cintra, et al. (1990). "Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups." *Brain Res* **532**(1-2): 271-7.
- Clark, C. T., Weissbach, H., Udenfriend, S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *J Biol Chem*, v.210, n.1, p.139-48, Sep. 1954.
- Claustre, Y., L. Rouquier, et al. (1988). "Pharmacological characterization of serotonin-stimulated phosphoinositide turnover in brain regions of the immature rat." *J Pharmacol Exp Ther* **244**(3): 1051-6.
- Colonnese, M., T., et al. NMDA Receptor Currents Suppress Synapse Formation on Sprouting Axons In Vivo. *The Journal of Neuroscience*. v.25, n.5, p.1291–1303. 2005.
- Cordoba, N. E., M. P. Arolfo, et al. (1994). "Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats." *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* **44**(3): 70-6.
- Costello, E. J., C. Worthman, et al. (2007). "Prediction from low birth weight to female adolescent depression: a test of competing hypotheses." *Arch Gen Psychiatry* **64**(3): 338-44.
- Cote, F., C. Fligny, et al. (2004). "Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function." *Trends Mol Med* **10**(5): 232-8.
- Cozzi, A., R. Carpenedo, et al. (1999). "Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[N-4-(nitrophenyl)thiazol-2-yl]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* **19**(7): 771-7.
- Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JP, et al. A role for suppressed thermogenesis favoring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes* 2003;52:1090–7.
- Crews, F., J. He, et al. (2007). "Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction." *Pharmacol Biochem Behav* **86**(2): 189-99.
- Crudo A, Petropoulos S, Moisiadis VG, Iqbal M, Kostaki A, Machnes Z, Szyf M, Matthews SG. Prenatal synthetic glucocorticoid treatment changes DNA methylation states in male organ systems: multigenerational effects. *Endocrinology* 2012;7:3269–3283.
- Cui Y, Jin J, Zhang X, Xu H, Yang L, Du D, Zeng Q, Tsien JZ, Yu H, Cao X. (2011) Forebrain NR2B overexpression facilitating the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice. *PLoS ONE*. 6:e20312.
- Cummins JM. The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization andm embryogenesis. *Reprod Biomed Online* 2002;2:176–182.
- Curzon, G. (1996). "Brain tryptophan. Normal and disturbed control." *Adv Exp Med Biol* **398**: 27-34.
- Da Silva Aragão et al. Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. *British Journal of Nutrition* (2014), 112, 328–337.
- Dahlstrom, A. and K. Fuxe (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." *Experientia* **20**(7): 398-9.
- Damms-Machado, A., A. Friedrich, et al. (2012). "Pre- and postoperative nutritional deficiencies in obese patients undergoing laparoscopic sleeve gastrectomy." *Obes Surg* **22**(6): 881-9.
- Datta, S. and J. A. Hobson (2000). "The rat as an experimental model for sleep neurophysiology." *Behav Neurosci* **114**(6): 1239-44.

- Daval, G., D. Verge, et al. (1987). "Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development." Int J Dev Neurosci **5**(3): 171-80.
- De Moura, E. G. et al. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. The Journal of nutritional biochemistry, v. 18, n. 2, p. 134-139, Feb 2007.
- De Hoz, L., S. J. Martin, et al. (2004). "Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory." PLoS Biol **2**(8): E225.
- De Souza, A. S., F. S. Fernandes, et al. "Effects of maternal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on brain fatty acids, learning, and memory." Nutr Rev **69**(3): 132-44.
- De Souza, A. S., C. Pacheco Lda, et al. (2008). "Brain fatty acid profiles and spatial learning in malnourished rats: effects of nutritional intervention." Nutr Neurosci **11**(3): 119-27.
- Debassio, W. A., T. L. Kemper, et al. (1994). "Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation." Brain Res Bull **35**(1): 57-61.
- Debassio, W. A., T. L. Kemper, et al. (1996). "Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus." Brain Res Bull **41**(6): 379-83.
- Dejana, E. (1996). "Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis." J Clin Invest **98**(9): 1949-53.
- Desai, M., C. D. Byrne, et al. (1997). "Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet." Am J Physiol **272**(5 Pt 1): G1083-90.
- Desai, M., N. J. Crowther, et al. (1996). "Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers." Br J Nutr **76**(4): 591-603.
- Diaz-Cintra, S., L. Cintra, et al. (1991). "Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata." J Comp Neurol **310**(3): 356-64.
- Diaz-Cintra, S., A. Gonzalez-Maciel, et al. (2007). "Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfields of the dorsal hippocampus." Exp Neurol **208**(1): 47-53.
- DiNatale, B. C., I. A. Murray, et al. (2010). "Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling." Toxicol Sci **115**(1): 89-97.
- Dobbing, J. (1968). "The development of the blood-brain barrier." Prog Brain Res **29**: 417-27.
- Dulloo AG, Girardier L. Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low-calorie intake: evidence for a specific metabolic component favoring fat storage. Am J Clin Nutr 1990;52:415-20.
- Dyck, R. H. and M. S. Cynader (1993a). "Autoradiographic localization of serotonin receptor subtypes in cat visual cortex: transient regional, laminar, and columnar distributions during postnatal development." J Neurosci **13**(10): 4316-38.
- Erhardt, S., H. Oberg, et al. (2001). "Pharmacological elevation of endogenous kynurenic acid levels activates nigral dopamine neurons." Amino Acids **20**(4): 353-62.
- Erhardt S et al. Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. Biol Psychiatry. v.56, p.255-260. 2004.
- Eriksson, J. G., T. Forsen, et al. (2001). "Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study." BMJ **322**(7292): 949-53.

- Eriksson, J. G., T. Forsen, et al. (1999). "Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study." BMJ **318**(7181): 427-31.
- Faber, K. M. and J. H. Haring (1999). "Synaptogenesis in the postnatal rat fascia dentata is influenced by 5-HT_{1a} receptor activation." Brain Res Dev Brain Res **114**(2): 245-52.
- Fagiolini, M. et al. Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. *PNAS*.v. 100, n.5, p.2854–2859. 2003.
- Fagundes ATS, Moura EG, Passos MCF, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, et al. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* 2007;98:922–8.
- Ferreira, E. S. W. T., B. A. Galvao, et al. (2009). "Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats." Neuroimmunomodulation **16**(4): 219-27.
- Fernstrom JD. Diet-induced changes in plasma amino acid pattern: effects on the brain uptake of large neutral amino acids, and on brain serotonin synthesis. *J Neural Transm*.v.15, p.55-67. 1979.
- Finkelstein, J. A., W. T. Chance, et al. (1982). "Brain serotonergic activity and plasma amino acid levels in genetically obese Zucker rats." Pharmacol Biochem Behav **17**(5): 939-44.
- Firk, C. and C. R. Markus (2009). "Mood and cortisol responses following tryptophan-rich hydrolyzed protein and acute stress in healthy subjects with high and low cognitive reactivity to depression." Clin Nutr **28**(3): 266-71.
- Forrest, C. M., O. S. Khalil, et al. (2013). "Changes in synaptic transmission and protein expression in the brains of adult offspring after prenatal inhibition of the kynurenine pathway." Neuroscience **254**: 241-59.
- Forrest, C. M., O. S. Khalil, et al. (2012). "Prenatal activation of Toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring." Mol Brain **5**: 22.
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 1999; 5442:1155–1158.
- Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder Ada R, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011;3:110–116.
- Frumento, G., R. Rotondo, et al. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." J Exp Med **196**(4): 459-68.
- Fukuda, M. T., A. L. Francolin-Silva, et al. (2002). "Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze." Behav Brain Res **133**(2): 271-7.
- Fukui, S., R. Schwarcz, et al. (1991). "Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism." J Neurochem **56**(6): 2007-17.
- Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 2012;5:1391–1400.
- Galler, J. R. and F. Ramsey (1989). "A follow-up study of the influence of early malnutrition on development: behavior at home and at school." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **28**(2): 254-61.

- Garcia-Ruiz, M., S. Diaz-Cintra, et al. (1993). "Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages." *Brain Res* **625**(2): 203-12.
- Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Lee PW, Devaskar SU. Embryo-transfer of the F2 postnatal calorie restricted female rat offspring into a control intra-uterine environment normalizes the metabolic phenotype. *Metabolism* 2013;62:432–441.
- Garlick, P. J., G. A. Clugston, et al. (1980). "Diurnal pattern of protein and energy metabolism in man." *Am J Clin Nutr* **33**(9): 1983-6.
- Gauguier D, Bihoreau MT, Ktorza A, Berthault MF, Picon L. Inheritance of diabetes mellitus as consequence of gestational hyperglycemia in rats. *Diabetes* 1990; 6:734–739.
- Gibbons, J. L., G. A. Barr, et al. (1979). "Manipulations of dietary tryptophan: effects on mouse killing and brain serotonin in the rat." *Brain Res* **169**(1): 139-53.
- Gluckman, P. and M. Hanson (2004). "The fetal matrix: evolution, developmental and diseases." *Cambridge University Press, Cambridge (in press)*.
- Gluckman, P. and G. Liggins (1984). "The regulation of fetal growth. in: Beard RW, Nathanielsz PW (eds) " *Fetal Physiology and Medicine*. Marcel Dekker: 511-558.
- Gluckman, P. D., W. Cutfield, et al. (2005). "The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk." *Early Hum Dev* **81**(1): 51-9.
- Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004a). "Living with the past: evolution, development, and patterns of disease." *Science* **305**(5691): 1733-6.
- Gluckman, P. D., P. C. Morel, et al. (1992). "Elevating maternal insulin-like growth factor-I in mice and rats alters the pattern of fetal growth by removing maternal constraint." *J Endocrinol* **134**(1): R1-3.
- Gniuli D, Calcagno A, Caristo ME, Mancuso A, Macchi V, Mingrone G, Vettor R. Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. *J Lipid Res* 2008;9:1936–1945.
- Godfrey, K., S. Robinson, et al. (1996). "Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth." *BMJ* **312**(7028): 410-4.
- Gould, T. J. and J. S. Higgins (2003). "Nicotine enhances contextual fear conditioning in C57BL/6J mice at 1 and 7 days post-training." *Neurobiol Learn Mem* **80**(2): 147-57.
- Granados-Rojas, L., N. Serrano, et al. (2002). "Prenatal protein malnutrition differentially affects the volume of the granule layer and mossy fibers in young male and female rats." *Proc West Pharmacol Soc* **45**: 53-4.
- Gueant, J. L., M. Caillerez-Fofou, et al. (2013). "Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase." *Biochimie* **95**(5): 1033-40.
- Guillemin, G. J., K. M. Cullen, et al. (2007). "Characterization of the kynurenine pathway in human neurons." *J Neurosci* **27**(47): 12884-92.
- Guillemin, G. J., S. J. Kerr, et al. (2005). "Involvement of quinolinic acid in AIDS dementia complex." *Neurotox Res* **7**(1-2): 103-23.
- Guillemin, G. J., D. G. Smith, et al. (2000). "Characterisation of kynurenine pathway metabolism in human astrocytes and implications in neuropathogenesis." *Redox Rep* **5**(2-3): 108-11.
- Guillemin, G. J., G. Smythe, et al. (2005). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons." *Glia* **49**(1): 15-23.

- Guillemin, G. J., K. R. Williams, et al. (2003). "Quinolinic acid in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Adv Exp Med Biol* **527**: 167-76.
- Guillemin G, Brew BJ. (2002). Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep.* 7:199–206.
- Guzik, A. C., J. O. Matthews, et al. (2006). "Dietary tryptophan effects on plasma and salivary cortisol and meat quality in pigs." *J Anim Sci* **84**(8): 2251-9.
- Haig, D. and C. Graham (1991). "Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor." *Cell* **64**(6): 1045-6.
- Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." *Diabetologia* **35**(7): 595-601.
- Hales, C. N. and D. J. Barker (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." *Br Med Bull* **60**: 5-20.
- Hamon, M. and S. Bourgoin (1979). "Ontogenesis of tryptophan transport in the rat brain." *J Neural Transm Suppl*(15): 93-105.
- Harding, J. D., V. Piacentino, 3rd, et al. (2001). "Electrophysiological alterations after mechanical circulatory support in patients with advanced cardiac failure." *Circulation* **104**(11): 1241-7.
- Hardingham GE, Bading H (2011). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11: 682–696.
- Harris, L.W., Sharp, T., Gartlon, J., Jones, D.N.C., Harrison, P.J., Long-term behavioural, molecular and morphological effects of neonatal NMDA receptor antagonism. *Eur. J. Neurosci.* v.18, p.1706–1710. 2003.
- Harrison M, Langley-Evans SC (2009) Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. *Br J Nutr* 101:1020–1030
- Hattori, M. and Y. Kotake (1984). "Studies on the urinary excretion of xanthurenic acid in diabetics." *Acta Vitaminol Enzymol* **6**(3): 221-8.
- Hedner, J., K. H. Lundell, et al. (1986). "Developmental variations in CSF monoamine metabolites during childhood." *Biol Neonate* **49**(4): 190-7.
- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Gijbels B, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.
- Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P., Parsons, L.H., et al. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Hemmings DG, Veerareddy S, Baker PN, Davidge ST. Increased myogenic responses in uterine but not mesenteric arteries from pregnant offspring of diet-restricted rat dams. *Biol Reprod* 2005;4:997–1003.
- Hendricks, T., N. Francis, et al. (1999). "The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes." *J Neurosci* **19**(23): 10348-56.
- Henry, J. A. (1996). "Ecstasy and serotonin depletion." *Lancet* **347**(9004): 833.
- Henry, Y., B. Seve, et al. (1992). "Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma free amino acids and hypothalamic serotonin." *J Anim Sci* **70**(6): 1873-87.

- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins." Brain Res Brain Res Rev **28**(3): 370-490.
- Hernandez, A., H. Burgos, et al. (2008). "Effect of prenatal protein malnutrition on long-term potentiation and BDNF protein expression in the rat entorhinal cortex after neocortical and hippocampal tetanization." Neural Plast **2008**: 646919.
- Heyes, M. P., C. L. Achim, et al. (1996). "Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid." Biochem J **320 (Pt 2)**: 595-7.
- Heyes, M. P., B. J. Brew, et al. (1991). "Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status." Ann Neurol **29**(2): 202-9.
- Hillion, J., J. B. Milne-Edwards, et al. (1993). "Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT1A receptor gene followed by PCR." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 991-7.
- Hinchliffe, S. A., M. R. Lynch, et al. (1992). "The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons." Br J Obstet Gynaecol **99**(4): 296-301.
- Hoyer, D., D. E. Clarke, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev **46**(2): 157-203.
- Humphrey, J. H. and R. Jaques (1954). "The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species." J Physiol **124**(2): 305-10.
- Huttenlocher, P. R. and A. S. Dabholkar (1997). "Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex." J Comp Neurol **387**(2): 167-78.
- Iaccarino, H. F., R. F. Suckow, et al. (2013). "The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia." Schizophr Res **150**(2-3): 392-7.
- Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchen MR, McConnell J. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. PLoS One 2010;4:e10074.
- Ikenasio-Thorpe BA, Breier BH, Vickers MH, Fraser M. Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. J Endocrinol 2007;193:31-7.
- Ikonomidou C, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science. v.283, p.70-74.1999.
- Ito, K. M., M. Sato, et al. (2000). "Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(4): H1786-95.
- Ito, S. and A. F. Sved (1997). "Tonic glutamate-mediated control of rostral ventrolateral medulla and sympathetic vasomotor tone." Am J Physiol **273**(2 Pt 2): R487-94.
- Iwasato, T. et al. Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. Nature. v.17, n.406, p.726-31. 2000.
- Jacobs, B. L. and E. C. Azmitia (1992). "Structure and function of the brain serotonin system." Physiol Rev **72**(1): 165-229.
- Janeway, H. H. (1918). "The Treatment of Tumors of the Superior Maxilla." Ann Surg **68**(4): 353-70.

- Jansson, N., J. Pettersson, et al. (2006). "Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet." *J Physiol* **576**(Pt 3): 935-46.
- Jansson, T. and T. L. Powell (2006). "IFPA 2005 Award in Placentology Lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? -- a review." *Placenta* **27 Suppl A**: S91-7.
- Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-Smith A et al. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 2009;2:460–468.
- Joshi, S. A., S. Shaikh, et al. (2003). "Postnatal development and testosterone dependence of a rat epididymal protein identified by neonatal tolerization." *Reproduction* **125**(4): 495-507.
- Ju, C. Y. and C. T. Tsai (1995). "Serotonergic mechanisms involved in the suppression of feeding by 5-HTP in rats." *Chin J Physiol* **38**(4): 235-40.
- Judy, W. V., A. M. Watanabe, et al. (1976). "Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat." *Circ Res* **38**(6 Suppl 2): 21-9.
- Julius, D., K. N. Huang, et al. (1990). "The 5HT2 receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(3): 928-32.
- Julius, D., T. J. Livelli, et al. (1989). "Ectopic expression of the serotonin 1c receptor and the triggering of malignant transformation." *Science* **244**(4908): 1057-62.
- Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S (2002) Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 10:682–688
- Kandaneeratchi, A. and B. J. Brew (2012). "The kynurenine pathway and quinolinic acid: pivotal roles in HIV associated neurocognitive disorders." *FEBS J* **279**(8): 1366-74.
- Khalil, O. S., M. Pizar, et al. (2014). "Prenatal inhibition of the kynurenine pathway leads to structural changes in the hippocampus of adult rat offspring." *Eur J Neurosci* **39**(10): 1558-71.
- Khazipov, R. and H. J. Luhmann (2006). "Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents." *Trends Neurosci* **29**(7): 414-8.
- Kehoea P., Kathy Mallinsona, Joseph Bronzinoa, Cheryl M. McCormickb (2001). Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Developmental Brain Research* 132. 23–31
- Kershaw, E. E. and Flier, J. S. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556
- King, R. S., W. A. DeBassio, et al. (2004). "Effects of prenatal protein malnutrition and acute postnatal stress on granule cell genesis in the fascia dentata of neonatal and juvenile rats." *Brain Res Dev Brain Res* **150**(1): 9-15.
- King, R. S., T. L. Kemper, et al. (2002). "Birthdates and number of neurons in the serotonergic raphe nuclei in the rat with prenatal protein malnutrition." *Nutr Neurosci* **5**(6): 391-7.
- Knudsen TB, Green ML. Response characteristics of the mitochondrial DNA genome in developmental health and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 4:313–329.

- Konradsson-Geuken, A., H. Q. Wu, et al. (2010). "Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry." Neuroscience **169**(4): 1848-59.
- Kontur, P. J., C. Leranth, et al. (1993). "Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and monoamine and metabolite levels in cryopreserved human fetal ventral mesencephalon." Exp Neurol **121**(2): 172-80.
- Koopmans, S. J., A. C. Guzik, et al. (2006). "Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets." J Anim Sci **84**(4): 963-71.
- Koopmans, S. J., M. Ruis, et al. (2009). "Surplus dietary tryptophan inhibits stress hormone kinetics and induces insulin resistance in pigs." Physiol Behav **98**(4): 402-10.
- Koopmans, S. J., M. Ruis, et al. (2005). "Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs." Physiol Behav **85**(4): 469-78.
- Kotaki Y, Ueda T, Mori T, Igaki S, Hattori M. Abnormal tryptophan metabolism and experimental diabetes by xanthurenic acid (XA) Acta Vitaminol Enzymol. 1975;**29**:236–239.
- Koe, B. K.; Weissman, A. p-Chlorophenylalanine: A specific depletor of brain serotonin. J. Pharmacol. Exp. Ther. v.154, p.499–516. 1966.
- Kudo, Y., C. A. Boyd, et al. (2003). "Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia." Biochim Biophys Acta **1638**(1): 63-71.
- Kwong, W. Y., A. E. Wild, et al. (2000). "Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension." Development **127**(19): 4195-202.
- Lam, C. K., M. Chari, et al. (2010). "Hypothalamic nutrient sensing activates a forebrain-hindbrain neuronal circuit to regulate glucose production in vivo." Diabetes **60**(1): 107-13.
- Lam MK, Homewood J, Taylor AJ, Mazurski EJ. Second generation effects of maternal alcohol consumption during pregnancy in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2000;**4**:619–631.
- Langley-Evans, S. C., R. C. Sherman, et al. (1999). "Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system." Biochem Soc Trans **27**(2): 88-93.
- Lapin, I. P., L. G. Mutovkina, et al. (1996). "Anxiogenic activity of quinolinic acid and kynurenine in the social interaction test in mice." J Psychopharmacol **10**(3): 246-9.
- Lapin IP (1978) Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. J Neural Transm **42**(1):37–43
- Lauder, J. M. (1990). "Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal." Ann N Y Acad Sci **600**: 297-313; discussion 314.
- Lauder, J. M. and H. Krebs (1976). "Effects of p-chlorophenylalanine on time of neuronal origin during embryogenesis in the rat." Brain Res **107**(3): 638-44.
- Lauder, J. M. and H. Krebs (1978). "Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis." Dev Neurosci **1**(1): 15-30.

- Lauder, J. M., J. A. Wallace, et al. (1981). "Roles for serotonin in neuroembryogenesis." Adv Exp Med Biol **133**: 477-506.
- Lawrence, A. D. and B. J. Sahakian (1998). "The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems." Neurochem Res **23**(5): 787-94.
- Lawrence, A. D., L. H. Watkins, et al. (2000). "Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease: implications for information processing in corticostriatal circuits." Brain **123** (Pt 7): 1349-64.
- Le Floch N, Melchior D, Sève B. (2008) Dietary tryptophan helps to preserve tryptophan homeostasis in pigs suffering from lung inflammation. J Anim Sci. Dec;86 (12):3473-9.
- Lee, J., K. B. Seroogy, et al. (2002). "Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice." J Neurochem **80**(3): 539-47.
- Lee, T. M., N. Spears, et al. (1989). "Maternal melatonin treatment influences rates of neonatal development of meadow vole pups." Biol Reprod **40**(3): 495-502.
- Leonard, B. E. and A. M. Myint (2009). "Immune dysfunction, depression and neurodegeneration." Acta Neuropsychiatr **21 Suppl 2**: 45-6.
- Leopoldo, M., Lacivita, E., Berardi, F., Perrone, R., and Hedlund, P. B. (2011) Serotonin 5-HT₇ receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. Pharmacol. Ther.
- Leslie, M. J., C. A. Bennett-Clarke, et al. (1992). "Serotonin 1B receptors form a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat." Brain Res Dev Brain Res **69**(1): 143-8.
- Levallois, C., C. Valence, et al. (1997). "Morphological and morphometric analysis of serotonin-containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development." Brain Res Dev Brain Res **99**(2): 243-52.
- Lidov, H. G. and M. E. Molliver (1982). "Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS." Brain Res Bull **9**(1-6): 559-604.
- Lidow, M. S. and P. Rakic (1992). "Scheduling of monoaminergic neurotransmitter receptor expression in the primate neocortex during postnatal development." Cereb Cortex **2**(5): 401-16.
- Lieben, C. K., A. Blokland, et al. (2004). "Acute tryptophan and serotonin depletion using an optimized tryptophan-free protein-carbohydrate mixture in the adult rat." Neurochem Int **44**(1): 9-16.
- Lin, G., C. Liu, et al. (2012). "Metabolomic analysis reveals differences in umbilical vein plasma metabolites between normal and growth-restricted fetal pigs during late gestation." J Nutr **142**(6): 990-8.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. v.25, n.4, p.402-8. 2001.
- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, et al. (2008). "Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake." Eur J Neurosci **27**(6): 1400-8.
- Lu, B. and A. Figurov (1997). "Role of neurotrophins in synapse development and plasticity." Rev Neurosci **8**(1): 1-12.
- Lucas, A. (1991). "Programming by early nutrition in man." Ciba Found Symp **156**: 38-50; discussion 50-5.

- Lucas, A. (1998). "Programming by early nutrition: an experimental approach." *J Nutr* **128**(2 Suppl): 401S-406S.
- Lucas, A., O. G. Brooke, et al. (1990). "Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study." *BMJ* **300**(6728): 837-40.
- Lucki, I.J. (1991). Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs. *Clin. Psychiatry* **52**, 24-31.
- Lukoyanov, N. V. and J. P. Andrade (2000). "Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation." *Behav Brain Res* **112**(1-2): 85-97.
- MacLean Jr WC, Graham GG. The effect of energy intake on nitrogen content of weight gained by recovering malnourished infants. *Am J Clin Nutr* 1980;33:903-9.
- Mackenzie, H. S. and B. M. Brenner (1995). "Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension?" *Am J Kidney Dis* **26**(1): 91-8.
- Maddison D.C.; Giorgini, F. (2015). The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v. 40, p.134-141.
- Mahan DC, Shields RG Jr. (1998) Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. *J Anim Sci*. Feb;76(2):513-21.
- Malina, R. M. (2001). "Physical activity and fitness: pathways from childhood to adulthood." *Am J Hum Biol* **13**(2): 162-72.
- Manjarrez, G., et al. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats (2003). *Int. J. Dev. Neurosci*. v.21, p.283-289.
- Manjarrez-Gutierrez, G., K. Martinez-Radilla, et al. (2012). "Increased expression of tryptophan-5-hydroxylase 1, but not 2, in brainstem as a result of intrauterine malnutrition." *Int J Dev Neurosci* **30**(6): 445-50.
- Manuel-Apolinar et al. (2014) Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: Implications of food intake. *Molecular Medicine Reports* **9**: 407-412.
- Marchand, M. C. and S. C. Langley-Evans (2001). "Intrauterine programming of nephron number: the fetal flaw revisited." *J Nephrol* **14**(5): 327-31.
- Markus, C. R., C. Firk, et al. (2008). "Effect of different tryptophan sources on amino acids availability to the brain and mood in healthy volunteers." *Psychopharmacology (Berl)* **201**(1): 107-14.
- Markus, C. R., B. Olivier, et al. (2000). "The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress." *Am J Clin Nutr* **71**(6): 1536-44.
- Martin JF, Johnston CS, Han CT, Benyshek DC. Nutritional origins of insulin resistance a rat model for diabetes-prone human populations. *J Nutr* 2000;4:741-744.
- Martin JR, Lieber SB, McGrath J, Shanabrough M, Horvath TL, Taylor HS. Maternal ghrelin deficiency compromises reproduction in female progeny through altered uterine developmental programming. *Endocrinology* 2011;5:2060-2066.
- Matos, R. J., R. Orozco-Solis, et al. (2011). "Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells." *Neuroscience* **196**: 16-24.

- Mazer, C., J. Muneyyirci, et al. (1997). "Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits." Brain Res **760**(1-2): 68-73.
- McMullen, S. and S. C. Langley-Evans (2005). "Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(1): R85-90.
- Mendelsohn, D., W. J. Riedel, et al. (2009). "Effects of acute tryptophan depletion on memory, attention and executive functions: a systematic review." Neurosci Biobehav Rev **33**(6): 926-52.
- Meyramov, G., V. Korchin, et al. (1998). "Diabetogenic activity of xanturenic acid determined by its chelating properties?" Transplant Proc **30**(6): 2682-4.
- Micheva, K. D. and C. Beaulieu (1996). "Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry." J Comp Neurol **373**(3): 340-54.
- Millan, M. J., Agid, Y., Brüne, M., Bullmore, E. T., Carter, C. S., Clayton, N. S., et al (2012). Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. Nat.Rev.Drug.Discov. **11**, 141–168.
- Miller, M., et al Tryptophan availability: relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats, Exp. Neurol., v.57 .p.142-157. 1977.
- Millan, M. J., Y. Agid, et al. (2012). "Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy." Nat Rev Drug Discov **11**(2): 141-68.
- Minzenberg, M. J. and C. S. Carter (2008). "Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition." Neuropsychopharmacology **33**(7): 1477-502.
- Mizutani, K., K. Sugimoto, et al. (2002). "Kynureninase is a novel candidate gene for hypertension in spontaneously hypertensive rats." Hypertens Res **25**(1): 135-40.
- Moffett, J. R., M. G. Espey, et al. (1993). "Antibodies to quinolinic acid reveal localization in select immune cells rather than neurons or astroglia." Brain Res **623**(2): 337-40.
- Moffett, J. R. and M. A. Namboodiri (2003). "Tryptophan and the immune response." Immunol Cell Biol **81**(4): 247-65.
- Mokler, D. J., J. D. Bronzino, et al. (1999). "The effects of median raphe electrical stimulation on serotonin release in the dorsal hippocampal formation of prenatally protein malnourished rats." Brain Res **838**(1-2): 95-103.
- Mokler, D. J., J. R. Galler, et al. (2003). "Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition." Brain Res Dev Brain Res **142**(2): 203-8.
- Molteni, R., R. J. Barnard, et al. (2002). "A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning." Neuroscience **112**(4): 803-14.
- Morgan CP, Bale TL. Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. J Neurosci 2011;33:11748–11755.
- Morgane, P., R. Austin-LaFrance, et al. (1992). "Malnutrition and the developing nervous system. In: Isaacson, R.; Jensen, K., eds. The vulnerable brain and environmental risks." Malnutrition and hazard assessment **1**: 3-44.
- Morgane, P. J., R. Austin-LaFrance, et al. (1993). "Prenatal malnutrition and development of the brain." Neurosci Biobehav Rev **17**(1): 91-128.

- Morgane, P. J., D. J. Mokler, et al. (2002). "Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation." *Neurosci Biobehav Rev* **26**(4): 471-83.
- Munipally, P. K., S. G. Agraharm, et al. (2011). "Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients." *Arch Physiol Biochem* **117**(5): 254-8.
- Nagatsu, I., T. Nagatsu, et al. (1971). "Adrenal enzymes of catecholamine biosynthesis and metabolism in spontaneously hypertensive rats." *Experientia* **27**(9): 1013-4.
- Nakamura, K. et al. Late developmental stagespecific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *Journal of Neuroscience*. v.26, p.530–534. 2006.
- Nakamura, K., Hasegawa, H. Development role of tryptophan hydroxylase in the nervous system. *Molecular Neurobiology*. v.35, p.45–53. 2007.
- Neel, J. V. (1962). "Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?" *Am J Hum Genet* **14**: 353-62.
- Neill, J. C., S. Barnes, et al. (2010). "Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism." *Pharmacol Ther* **128**(3): 419-32.
- Newcomer, R., J. Swan, et al. (2001). "Residential care supply and cognitive and physical problem case mix in nursing homes." *J Aging Health* **13**(2): 217-47.
- Niinisalo, P., A. Raitala, et al. (2008). "Indoleamine 2,3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: the Health 2000 study." *Scand J Clin Lab Invest* **68**(8): 767-70.
- Niitsu, Y., S. Hamada, et al. (1995). "Regulation of synapse density by 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonist in the spinal cord of chicken embryo." *Neurosci Lett* **195**(3): 159-62.
- Nilsson, T., J. Longmore, et al. (1999). "Contractile 5-HT_{1B} receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry." *Br J Pharmacol* **128**(6): 1133-40.
- Nishizawa, S., C. Benkelfat, et al. (1997). "Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5308-13.
- Noto Y, Okamoto H. (1978) Inhibition by kynurenine metabolites of proinsulin synthesis in isolated pancreatic islets. *Acta Diabetol Lat*. 15:273–82
- Okuno, A., T. Fukuwatari, et al. (2011). "High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum." *J Neurochem* **118**(5): 796-805.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes de Souza, et al. (2009). "Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding." *Physiol Behav* **96**(3): 481-92.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2010). "Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(7): 990-1000.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;6988:154.
- Ozanne SE, Constanica M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;7:539–546.
- Ozane et al. 1996. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *American journal of physiology*. 271, 1128-1134.

- Oxenkrug, G. and R. Ratner (2012). "N-acetylserotonin and aging-associated cognitive impairment and depression." *Aging Dis* **3**(4): 330-8.
- Oxenkrug, G. F. (2011). "Interferon-gamma-inducible kynurenines/pteridines inflammation cascade: implications for aging and aging-associated psychiatric and medical disorders." *J Neural Transm (Vienna)* **118**(1): 75-85.
- Oxenkrug, G. F. and P. J. Requentina (2003). "Melatonin and jet lag syndrome: experimental model and clinical implications." *CNS Spectr* **8**(2): 139-48.
- Ozelci A, Romsos DR, Leveille GA. Influence of initial food restriction on subsequent body weight gain and body fat accumulation in rats. *J Nutr* 1978;108:1724–32.
- Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP (2005) Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 20:345–352
- Pardridge, W. M. (1979). "Tryptophan transport through the blood-brain barrier: in vivo measurement of free and albumin-bound amino acid." *Life Sci* **25**(17): 1519-28.
- Pardridge, W. M. (1993). "Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain barrier." *Ann N Y Acad Sci* **692**: 126-37.
- Pardridge, W. M. (1998). "CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport." *J Neurochem* **70**(5): 1781-92.
- Parent, A. (1981). "Comparative anatomy of the serotonergic systems." *J Physiol (Paris)* **77**(2-3): 147-56.
- Parks,C.L.,Robinson,P.S.,Sibille,E.,Shenk,T.,andToth,M.(1998).Increased anxietyofmicelackingtheserotonin1Areceptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 10734–10739.doi:10.1073/pnas.95.18.10734
- Parsons et al. Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *BMJ*, v. 323, n. 7325, p. 1331-1335, 2001.
- Passos, M. C., C. F. Ramos, et al. (2000). "The effect of protein or energy restriction on the biodistribution of Na⁹⁹TcmO₄ in Wistar rats." *Nucl Med Commun* **21**(11): 1059-62.
- Patterson, A. D., J. A. Bonzo, et al. (2011). "Metabolomics reveals attenuation of the SLC6A20 kidney transporter in nonhuman primate and mouse models of type 2 diabetes mellitus." *J Biol Chem* **286**(22): 19511-22.
- Pazos, A., R. Cortes, et al. (1984). "Quantitative receptor autoradiography: application to the characterization of multiple receptor subtypes." *J Recept Res* **4**(1-6): 645-56.
- Peixoto-Silva N, Frantz ED, Mandarim-de-Lacerda CA, Pinheiro-Mulder A. Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2011;9:1364–1373.
- Pedra, J. H., A. Brandt, et al. (2003). "Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and alpha-amylases associated with food breakdown." *Insect Mol Biol* **12**(4): 405-12.
- Pentinat T, Ramon-Krauel M, Cebria J, Diaz R, Jimenez-Chillaron JC. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. *Endocrinology* 2010;12:5617–5623.
- Perkins, M. N. and T. W. Stone (1982). "An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid." *Brain Res* **247**(1): 184-7.
- Peroutka, S. J. (1994). "Molecular biology of serotonin (5-HT) receptors." *Synapse* **18**(3): 241-60.

- Peroutka, S. J., R. M. Lebovitz, et al. (1979). "Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides." *Mol Pharmacol* **16**(3): 700-8.
- Pertovaara, M., A. Raitala, et al. (2007). "Autoimmunity and atherosclerosis: functional polymorphism of PTPN22 is associated with phenotypes related to the risk of atherosclerosis. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study." *Clin Exp Immunol* **147**(2): 265-9.
- Petrik, J., B. Reusens, et al. (1999). "A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II." *Endocrinology* **140**(10): 4861-73.
- Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008;5:381–392.
- Pinto ML, Shetty PS. Influence of exercise-induced maternal stress on fetal outcome in Wistar rats: inter-generational effects. *Br J Nutr* 1995;5:645–653.
- Pihl, R. O., S. N. Young, et al. (1995). "Acute effect of altered tryptophan levels and alcohol on aggression in normal human males." *Psychopharmacology (Berl)* **119**(4): 353-60.
- Pisar, M., C. M. Forrest, et al. (2014). "Modified neocortical and cerebellar protein expression and morphology in adult rats following prenatal inhibition of the kynurenine pathway." *Brain Res* **1576**: 1-17.
- Plagemann, A., T. Harder, et al. (2000). "Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams." *J Nutr* **130**(10): 2582-9.
- Plagemann A, Waas T, Harder T, Rittel F, Ziska T, Rohde W. Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides* 2000;34:1–6.
- Pocivavsek, A., H. Q. Wu, et al. (2012). "Pre- and postnatal exposure to kynurenine causes cognitive deficits in adulthood." *Eur J Neurosci* **35**(10): 1605-12.
- Pocivavsek, A., H. Q. Wu, et al. (2011). "Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory." *Neuropsychopharmacology* **36**(11): 2357-67.
- Poston, L. (2006). "Endothelial dysfunction in pre-eclampsia." *Pharmacol Rep* **58 Suppl**: 69-74.
- Potter, M. C., G. I. Elmer, et al. (2010). "Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior." *Neuropsychopharmacology* **35**(8): 1734-42.
- Rafice, S. A., N. Chauhan, et al. (2009). "Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 2): 408-12.
- Rahman, A., K. Ting, et al. (2009). "The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons." *PLoS One* **4**(7): e6344.
- Raju, T. N., V. R. Kanth, et al. (2007). "Influence of kynurenines in pathogenesis of cataract formation in tryptophan-deficient regimen in Wistar rats." *Indian J Exp Biol* **45**(6): 543-8.
- Rakic, P. and P. S. Goldman-Rakic (1982). "The development and modifiability of the cerebral cortex. Overview." *Neurosci Res Program Bull* **20**(4): 433-8.
- Ramos, A. J., et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity following serotonin depletion. *Brain Res*. v.958, p.112–121. 2002.

- Randall R, Adams D, Ollerton RL, Lewis M, Alcolado JC. Type 2 diabetes mellitus— genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. *Diabetologia* 2004;8:1354–1359.
- Rapport, M. M., A. A. Green, et al. (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation." *J Biol Chem* **176**(3): 1237-41.
- Rassoulpour, A., H. Q. Wu, et al. (2005). "Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum." *J Neurochem* **93**(3): 762-5.
- Ravelli, A. C., J. H. van der Meulen, et al. (1998). "Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine." *Lancet* **351**(9097): 173-7.
- Ravelli, A. C., J. H. van Der Meulen, et al. (1999). "Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally." *Am J Clin Nutr* **70**(5): 811-6.
- Ravelli, G. P., Z. A. Stein, et al. (1976). "Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy." *N Engl J Med* **295**(7): 349-53.
- Redish, A. D. and D. S. Touretzky (1998). "The role of the hippocampus in solving the Morris water maze." *Neural Comput* **10**(1): 73-111.
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;5532:1089–1093.
- Resnick, O. and P. J. Morgane (1984). "Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rats." *Brain Res* **303**(1): 163-70.
- Rios, C. and A. Santamaria (1991). "Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates." *Neurochem Res* **16**(10): 1139-43.
- Roberts K.M; Fitzpatrick P.F. Mechanisms of Tryptophan and Tyrosine Hydroxylase. *IUBMB Life*.v.65, n.4, p. 350–357. 2013.
- Robert, P. H. and M. Benoit (2008). "Neurochemistry of cognition: serotonergic and adrenergic mechanisms." *Handb Clin Neurol* **88**: 31-40.
- Rogers, K. S. and S. J. Evangelista (1985). "3-Hydroxykynurenine, 3-hydroxyanthranilic acid, and o-aminophenol inhibit leucine-stimulated insulin release from rat pancreatic islets." *Proc Soc Exp Biol Med* **178**(2): 275-8.
- Rotta, L. N., A. P. Schmidt, et al. (2003). "Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain." *Neurochem Res* **28**(8): 1181-6.
- Rubenstein, J. L. (1998). "Development of serotonergic neurons and their projections." *Biol Psychiatry* **44**(3): 145-50.
- Ruddick, J. P., A. K. Evans, et al. (2006). "Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications." *Expert Rev Mol Med* **8**(20): 1-27.
- Russo, S., I. P. Kema, et al. (2003). "Tryptophan as a link between psychopathology and somatic states." *Psychosom Med* **65**(4): 665-71.
- Rutland, C. S., A. O. Latunde-Dada, et al. (2007). "Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta." *Placenta* **28**(7): 734-42.
- Sambeth, A., A. Blokland, et al. (2007). "Sex differences in the effect of acute tryptophan depletion on declarative episodic memory: a pooled analysis of nine studies." *Neurosci Biobehav Rev* **31**(4): 516-29.
- Sandler, M., M. A. Reveley, et al. (1981). "Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review." *J Clin Pathol* **34**(3): 292-302.
- Sano, M., V. Ferchaud-Roucher, et al. (2014). "Simultaneous detection of stable isotope-labeled and unlabeled L-tryptophan and of its main metabolites, L-kynurenine,

- serotonin and quinolinic acid, by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry." *J Mass Spectrom* **49**(2): 128-35.
- Sapko, M. T., P. Guidetti, et al. (2006). "Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate: Implications for Huntington's disease." *Exp Neurol* **197**(1): 31-40.
- Sarter, M., J. P. Bruno, et al. (2007). "Abnormal neurotransmitter release underlying behavioral and cognitive disorders: toward concepts of dynamic and function-specific dysregulation." *Neuropsychopharmacology* **32**(7): 1452-61.
- Sarwar, G. and H. G. Botting (1999). "Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats." *J Nutr* **129**(9): 1692-7.
- Sathyaikumar, K. V., E. K. Stachowski, et al. (2010). "Dysfunctional kynurenine pathway metabolism in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." *J Neurochem* **113**(6): 1416-25.
- Scarpellini, E. and J. Tack (2012). "Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition." *Dig Dis* **30**(2): 148-53.
- Schrocksadel, K., B. Widner, et al. (2003). "Tryptophan degradation during and after gestation." *Adv Exp Med Biol* **527**: 77-83.
- Schwarcz, R., J. P. Bruno, et al. (2012). "Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology." *Nat Rev Neurosci* **13**(7): 465-77.
- Schwarcz, R. and C. Kohler (1983). "Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid." *Neurosci Lett* **38**(1): 85-90.
- Schwarcz, R., W. O. Whetsell, Jr., et al. (1983). "Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain." *Science* **219**(4582): 316-8.
- Scrimshaw, N. S., C. E. Taylor, et al. (1968). "Interactions of nutrition and infection." *Monogr Ser World Health Organ* **57**: 3-329.
- Sedlmayr P. et al. The role of placental tryptophan catabolism. *Frontiers in Immunology* v.5. 2014.
- Shea, M. M., J. A. Mench, et al. (1990). "The effect of dietary tryptophan on aggressive behavior in developing and mature broiler breeder males." *Poult Sci* **69**(10): 1664-9.
- Shen, W. Z., Z. B. Luo, et al. (1989). "Immunohistochemical studies on the development of 5-HT (serotonin) neurons in the nuclei of the reticular formations of human fetuses." *Pediatr Neurosci* **15**(6): 291-5.
- Shepard, P. D., B. Joy, et al. (2003). "Micromolar brain levels of kynurenic acid are associated with a disruption of auditory sensory gating in the rat." *Neuropsychopharmacology* **28**(8): 1454-62.
- Sherman, R. C. and S. C. Langley-Evans (1998). "Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat." *Clin Sci (Lond)* **94**(4): 373-81.
- Sherman, R. C. and S. C. Langley-Evans (2000). "Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat." *Clin Sci (Lond)* **98**(3): 269-75.
- Silber, B. Y. and J. A. Schmitt (2010). "Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep." *Neurosci Biobehav Rev* **34**(3): 387-407.

- Silveira, I. L., T. M. Maranhao, et al. (2007). "Metabolic syndrome in postmenopausal women: higher prevalence in the Northeastern Region of Brazil than in other Latin American countries and the influence of obesity and socioeconomic factors." Climacteric **10**(5): 438-9; author reply 440.
- Singhal, A., T. J. Cole, et al. (2004). "Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health?" Circulation **109**(9): 1108-13.
- Singhal, A., T. J. Cole, et al. (2007). "Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure?" Circulation **115**(2): 213-20.
- Soto-Moyano, R., V. Fernandez, et al. (1999). "Effects of mild protein prenatal malnutrition and subsequent postnatal nutritional rehabilitation on noradrenaline release and neuronal density in the rat occipital cortex." Brain Res Dev Brain Res **116**(1): 51-8.
- Stern, W. C., P. J. Morgane, et al. (1975). "Protein malnutrition in rats: response of brain amines and behavior to foot shock stress." Exp Neurol **47**(1): 56-67.
- Stone TW, Mackay GM, Forrest CM, Clark CJ, Darlington LG (2003) Tryptophan metabolites and brain disorders. Clin Chem Lab Med **41**(7):852–859
- Stone, T. W. and L. G. Darlington (2002). "Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development." Nat Rev Drug Discov **1**(8): 609-20.
- Stone, T. W. and M. N. Perkins (1981). "Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS." Eur J Pharmacol **72**(4): 411-2.
- Sundstrom, E., S. Kolare, et al. (1993). "Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester." Brain Res Dev Brain Res **75**(1): 1-12.
- Tadaiesky, M. T., P. A. Dombrowski, et al. (2008). "Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease." Neuroscience **156**(4): 830-40.
- Ting KK, Brew BJ, Guillemin GJ (2009). Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation **6**: AR 36.
- Thomson J, Ashcroft RankinH, GW YatesCM, McQueen JK, Cummings SW (1982) The treatment of depression in general practice: a comparison of L-tryptophan amitriptyline, and a combination of L-tryptophan and amitriptyline with placebo. Psychol Med **12**:741–751.
- Tonkiss, J., J. Galler, et al. (1993). "Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function." Ann N Y Acad Sci **678**: 215-27.
- Tonkiss, J. and J. R. Galler (1990). "Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats." Behav Brain Res **40**(2): 95-107.
- Toth, G. and M. Fekete (1986). "5-Hydroxyindole acetic excretion in newborns, infants and children." Acta Paediatr Hung **27**(3): 221-6.
- Toth,M.(2003).5-HT1Areceptorknockoutmouseasageneticmodelofanxiety. Eur.J.Pharmacol. **463**, 177–174.doi:10.1016/S0014-2999(03)01280-9
- Torrens C, Poston L, Hanson MA (2008) Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation. Br J Nutr **100**:760–766

- Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L, Hanson MA. Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol* 2003;547(Pt 1):77–84.
- Trecartin, K. V. and D. J. Bucci (2011). "Administration of kynurenine during adolescence, but not during adulthood, impairs social behavior in rats." *Schizophr Res* **133**(1-3): 156-8.
- Twarog, B. M. and I. H. Page (1953). "Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination." *Am J Physiol* **175**(1): 157-61.
- Ultanir, S.K., et al., Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.104, p.19553–19558. 2007.
- Ying W (2008) NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal* **10**(2):179–206
- Verier-Mine O. Outcomes in women with a history of gestational diabetes. Screening and prevention of type 2 diabetes. Literature review. *Diabetes Metab* 2010;6(Pt 2):595–616.
- Walker, S. P., S. M. Grantham-Mcgregor, et al. (2000). "Effects of growth restriction in early childhood on growth, IQ, and cognition at age 11 to 12 years and the benefits of nutritional supplementation and psychosocial stimulation." *J Pediatr* **137**(1): 36-41.
- Wallace, J., D. Bourke, et al. (2001). "Nutrient partitioning during adolescent pregnancy." *Reproduction* **122**(3): 347-57.
- Wallace, J. A. and J. M. Lauder (1983). "Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study." *Brain Res Bull* **10**(4): 459-79.
- Wang, J., N. Simonavicius, et al. (2006). "Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35." *J Biol Chem* **281**(31): 22021-8.
- Wang, L. and R. J. Xu (2007). "The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats." *Asia Pac J Clin Nutr* **16 Suppl 1**: 467-72.
- Wang, M., M. Crager, et al. (2012). "Modulation of apoptosis pathways by oxidative stress and autophagy in beta cells." *Exp Diabetes Res* **2012**: 647914.
- Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;15:5293–5300.
- Watts SW, Shaw S, Burnett R, Dorrance AM. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase in periaortic fat: mechanisms of inhibition of contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301:H1236–47.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, M. Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;8:847–854.
- West-Eberhard, M. J. (2005). "Developmental plasticity and the origin of species differences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 Suppl 1**: 6543-9.
- Whetsell, W. O., Jr. and R. Schwarcz (1989). "Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system." *Neurosci Lett* **97**(3): 271-5.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). "Serotonin and brain development: role in human developmental diseases." *Brain Res Bull* **56**(5): 479-85.

- Whitaker-Azmitia, P. M., M. Druse, et al. (1996). "Serotonin as a developmental signal." Behav Brain Res **73**(1-2): 19-29.
- Wiggins, R. C., G. Fuller, et al. (1984). "Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems." Life Sci **35**(21): 2085-94.
- Wilson, C. C., K. M. Faber, et al. (1998). "Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT1a receptors: evidence for a glial mechanism." Brain Res **782**(1-2): 235-9.
- Winnicki, S. (1969). "[Dynamics of the development of the bronchi in childhood and radiographic analysis of the number and the site of their origin with particular consideration of developmental variations. I]." Pol Przegl Radiol Med Nukl **33**(6): 747-52.
- Wirleitner, B., V. Rudzite, et al. (2003). "Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease." Eur J Clin Invest **33**(7): 550-4.
- Wolf, D. H. and M. Hoffmann (1974). "Tryptophan synthase from yeast. Purification by affinity chromatography, physical properties." Eur J Biochem **45**(1): 269-76.
- Wolfensberger, M., U. Amsler, et al. (1983). "Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue." Neurosci Lett **41**(3): 247-52.
- Wolowczuk, I., B. Hennart, et al. (2012). "Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **303**(2): R135-43.
- Wu, A. H. (2000). "Diet and breast carcinoma in multiethnic populations." Cancer **88**(5 Suppl): 1239-44.
- Wyatt, R. J., T. Vaughan, et al. (1972). "Behavioral changes of chronic schizophrenic patients given L-5-hydroxytryptophan." Science **177**(4054): 1124-6.
- Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Res 2004;32:e38.
- Yavarone, M. S., D. L. Shuey, et al. (1993). "Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse." Placenta **14**(2): 149-61.
- Yildiz, O., F. Ehlert, et al. (1998). "Characterization of the "silent" 5-HT1B receptors of rabbit iliac artery." Ann N Y Acad Sci **861**: 259.
- Young, S. N. and M. Leyton (2002). "The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels." Pharmacol Biochem Behav **71**(4): 857-65.
- Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. Cell Metab 2005;1:371–8.
- Zamanakou, M., A. E. Germenis, et al. (2007). "Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." Immunol Lett **111**(2): 69-75.
- Zamenhof, S. (1991). "Neonatal brain parameters: outstanding tails of normal distribution." Cytobios **67**(270-271): 177-81.
- Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Larrea F, Nathanielsz PW (2005) Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. J Physiol 566:225–236

- Zhang, Z. W. (2003). "Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development." *J Neurosci* **23**(8): 3373-84.
- Zheng, X. et al (2012). "Quantitative analysis of neurochemical panel in rat brain and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Anal Chem* **84** (22): 10044-51.
- Zhou X, Sun H, Ellen TP, Chen H, Costa M. Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis* 2008;9:1831–1836.
- Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 2013;3:259–266.
- Zucker, M. (1944). A study of the substances in blood serum and platelets which stimulate smooth muscle. *Am J Physiol*, v.142, p.12–26.
- Zwilling, D. et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell*.v.10, n.145, p. 863–874. 2011.
- Wirleitner, B., V. Rudzite, et al. (2003). "Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease." *Eur J Clin Invest* **33**(7): 550-4.
- Wolf, D. H. and M. Hoffmann (1974). "Tryptophan synthase from yeast. Purification by affinity chromatography, physical properties." *Eur J Biochem* **45**(1): 269-76.
- Wolfensberger, M., U. Amsler, et al. (1983). "Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue." *Neurosci Lett* **41**(3): 247-52.
- Wolowczuk, I., B. Hennart, et al. (2012). "Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**(2): R135-43.
- Wu, A. H. (2000). "Diet and breast carcinoma in multiethnic populations." *Cancer* **88**(5 Suppl): 1239-44.
- Wyatt, R. J., T. Vaughan, et al. (1972). "Behavioral changes of chronic schizophrenic patients given L-5-hydroxytryptophan." *Science* **177**(4054): 1124-6.
- Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004;3:e38.
- Yavarone, M. S., D. L. Shuey, et al. (1993). "Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse." *Placenta* **14**(2): 149-61.
- Yildiz, O., F. Ehlert, et al. (1998). "Characterization of the "silent" 5-HT1B receptors of rabbit iliac artery." *Ann N Y Acad Sci* **861**: 259.
- Young, S. N. and M. Leyton (2002). "The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels." *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4): 857-65.
- Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 2005;1:371–8.
- Zamanakou, M., A. E. Germenis, et al. (2007). "Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Immunol Lett* **111**(2): 69-75.
- Zamenhof, S. (1991). "Neonatal brain parameters: outstanding tails of normal distribution." *Cytobios* **67**(270-271): 177-81.
- Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Larrea F, Nathanielsz PW (2005) Sex differences in transgenerational

- alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 566:225–236
- Zhang, Z. W. (2003). "Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development." *J Neurosci* 23(8): 3373-84.
- Zheng, X. et al (2012). "Quantitative analysis of neurochemical panel in rat brain and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Anal Chem* 84 (22): 10044-51.
- Zhou X, Sun H, Ellen TP, Chen H, Costa M. Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis* 2008;9:1831–1836.
- Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 2013;3:259–266.
- Zucker, M. (1944). A study of the substances in blood serum and platelets which stimulate smooth muscle. *Am J Physiol*, v.142, p.12–26.
- Zwilling, D. et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell*.v.10, n.145, p. 863–874. 2011.