

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INTERAÇÃO DEXAMETASONA/ VITAMINAS ANTIOXIDANTES
NO CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO: ANÁLISE
ELETROFISIOLÓGICA NO RATO ALBINO**

ANDRÉIA ALBUQUERQUE CUNHA LOPES

ORIENTADOR
PROFESSOR RUBEM CARLOS ARAÚJO GUEDES

RECIFE, 2014

ANDRÉIA ALBUQUERQUE CUNHA LOPES

INTERAÇÃO DEXAMETASONA/ VITAMINAS ANTIOXIDANTES NO CÉREBRO
EM DESENVOLVIMENTO: ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA NO RATO ALBINO

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco, sob orientação do
Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes.

RECIFE

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lopes, Andréia Albuquerque Cunha

Interação dexametasona/ vitaminas antioxidantes no cérebro em desenvolvimento: análise eletrofisiológica no rato albino/ Recife: O Autor, 2014.

70 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. **Glicocorticoides 2. Vitaminas 3. Depressão cortical alastrante I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (orientador) II.**

573.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 227

ANDRÉIA ALBUQUERQUE CUNHA LOPES

INTERAÇÃO DEXAMETASONA/ VITAMINAS ANTIOXIDANTES NO CÉREBRO
EM DESENVOLVIMENTO: ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA NO RATO ALBINO

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

Aprovado por:

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Prof. Dr Luiz Bezerra de Carvalho

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues

Profa. Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos

Data: 25 / Julho / 2014

À minha família (pais, irmãos, marido, sogros, cunhados, primos, tios e avós), os quais me apoiam e incentivam a sempre seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, Professor Rubem Carlos Araújo Guedes, pela sua dedicação e apoio em todas as etapas necessárias para ingresso e conclusão do mestrado. O Professor Rubem é um exemplo no qual eu quero me espelhar ao longo da carreira por mim escolhida (a acadêmica). A ele, eu devo grande parte do meu crescimento na pesquisa, na neurociência, na ortografia e na vida. Professor, Muito obrigada!

Aos demais coautores do artigo recentemente submetido à revista *Brain Research* (resultado do projeto de mestrado): Rosângela Figueiredo Mendes da Silva e Eryka Maria dos Santos; que acompanharam e colaboraram efetivamente em todas as etapas da realização da pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT). Agradeço pela atenção e carinho que me foram fornecidos ao longo desses seis anos que faço parte do grupo. Todos nós (membros do LAFINNT) formamos uma grande e linda família.

À professora Manuella Batista de Oliveira; por ter me introduzido no mundo da pesquisa científica e por sempre me encorajar a seguir em frente. A ela e ao professor Rubem Carlos Araújo Guedes, devo grande parte do meu conhecimento em pesquisa e neurociência.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa a mim fornecida ao longo dos dois anos de mestrado.

RESUMO

Dexametasona (Dex) é um hormônio glicocorticoide sintético, empregado em recém-nascidos prematuros com doença pulmonar crônica. O tratamento com glicocorticoides pode produzir efeitos eletrofisiológicos adversos no sistema nervoso em desenvolvimento (LIN; HUANG; HSU, 2006). Postula-se que tais efeitos estejam associados ao estresse oxidativo. Neste trabalho foram avaliados, em ratos albinos já desenvolvidos (60-70 dias de idade), os efeitos do tratamento neonatal com Dex sobre o fenômeno eletrofisiológico conhecido como depressão alastrante cortical (DAC). Adicionalmente, foi investigado se a administração das vitaminas antioxidantes C e E são capazes de atenuá-los. Ratos machos Wistar (n=47) foram distribuídos em cinco grupos experimentais: [1] Ingênuo (Ing), sem tratamento; [2] Veículo (V); [3] Dexametasona (Dex); [4] Dexametasona com vitamina C e E (DexCE) e [5] Vitaminas C e E (CE). A dexametasona (dissolvida em NaCl 0,9%) foi administrada nos três primeiros dias pós-natais (DPN), na dose de 0,5mg/Kg (DPN=1), 0,3mg/Kg (DPN=2) e 0,1mg/Kg (DPN=3). As vitaminas antioxidantes C (200 mg/kg/dia) e E (100 mg/kg/dia) foram aplicadas diariamente em PND 1-6, dissolvidas respectivamente em salina e óleo. Entre 60 e 70 dias de vida a DAC foi registrada no córtex parietal e sua velocidade de propagação, amplitude e duração da variação lenta de voltagem (VLV), e amplitude do eletrocorticograma (ECoG) foram calculados. O grupo Dex apresentou maiores velocidades de propagação da DAC (Médias $\pm$ DP; 4,14 mm/min $\pm$ 0,22; n = 10) em comparação aos grupos controles (Ing: 3,52 mm/min $\pm$ 0,13; n=8; V: 3,57 mm/min $\pm$ 0,18; n= 10; CE: 3,51 mm/min $\pm$ 0,24; n=10). Esse efeito foi antagonizado pela adição das vitaminas C e E (grupo DexCE; velocidades da DAC = 3,43 mm/min $\pm$ 0,12; n = 9). Os valores de amplitude e duração da VLV foram semelhantes entre os grupos. Em todos os grupos, após a passagem da DAC pelo tecido cortical, a amplitude do ECoG aumentou cerca de 50% comparado com a amplitude basal do mesmo animal, mas sem diferenças entre os grupos. Logo, o efeito da Dex de acelerar a propagação da DAC parece ser duradouro, visto que foi observado em um cérebro desenvolvido. A associação com vitaminas C e E neutralizam o efeito da Dex sobre a DAC. Entretanto, os tratamentos empregados não influenciaram a potenciação da atividade elétrica cortical espontânea associada a DAC.

Palavras-chave: glicocorticoides; dexametasona; vitaminas antioxidantes; desenvolvimento cerebral; depressão alastrante.

ABSTRACT

Dexamethasone (Dex) is a synthetic glucocorticoid, which is applied to preterm infants for treating chronic lung diseases. The glucocorticoid treatment may produce adverse electrophysiologic effects in the developing brain. It is proposed that its effects are associated to oxidative stress. In this study it was evaluated, in developed rats (60-70 days old), the effects of neonatal Dex treatment on the electrophysiological phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). Additionally, it was investigated if the antioxidant vitamins C and E minimize these effects. Wistar rats (n=47) were distributed in five groups: [1] no treatment (Naïve); [2] Vehicle (V); [3] Dexamethasone (Dex); [4] Dex with vitamins C and E and [5] Vitamins C and E (CE). Dex (soluble in 0.9% NaCl) was administered on the three first postnatal days (PND) at 0.5mg/Kg (PND=1), 0.3mg/Kg (PND=2) e 0.1mg/Kg (PND=3). Antioxidant vitamins C (200 mg/kg/dia) and E (100 mg/kg/dia) were administered daily on PND1-6, soluble in 0.9% NaCl and olive oil, respectively. On PND 60-70, CSD was recorded on parietal cortex and its velocity, slow potential change (P) duration and amplitude and electrocorticogram (ECoG) amplitude were calculated. Dex showed higher CSD-velocities (mean values $\pm$ SD; 4.14 mm/min $\pm$ 0.22; n = 10) than the control groups (Naïve: 3.52 mm/min $\pm$ 0.13; n=8; V: 3.57 mm/min $\pm$ 0.18; n= 10; CE: 3.51 mm/min $\pm$ 0.24; n=10). This effect was antagonized by vitamins C and E (DexCE group; CSD velocity = 3.43 mm/min $\pm$ 0.12; n = 9). P amplitude and duration were similar between the groups. In all groups, after the brain cortex undergo CSD, the ECoG amplitude increased about 50% when compared to the basal amplitude of the same animal. However, there were no treatment-related differences. Therefore, Dex's acceleration of the CSD propagation seems to be permanent, as it was successfully observed in a fully developed brain. The association of C and E vitamins counteracts this acceleration caused by the use of Dex. However, the administered treatments did not interfere with the CSD-associated spontaneous electric activity potentiation.

Keywords: glucocorticoids; dexamethasone; antioxidant vitamins; brain development; spreading depression

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	100
2.1 GLICOCORTICOIDES E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	10
2.2 GLICOCORTICOIDES E ESTRESSE OXIDATIVO	13
2.3 AÇÃO DAS VITAMINAS ANTIOXIDANTES C e E SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO	15
2.4 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL COMO MODELO PARA AVALIAR EXCITABILIDADE CORTICAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
2.5 AÇÃO DA DEXAMETASONA E DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA E EXCITABILIDADE DO CÓRTEX CEREBRAL.....	244
3. HIPÓTESE.....	27
4. OBJETIVOS	27
4.1. GERAL.....	27
4.2. ESPECÍFICOS.....	27
5. REFERÊNCIAS	28
6. ARTIGO SUBMETIDO A <i>BRAIN RESEARCH</i>.....	42
7. CONCLUSÕES	67
8. PERSPECTIVAS PARA FUTURAS PESQUISAS	68
 ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	 69
ANEXO 2 – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A <i>BRAIN RESEARCH</i>	 70

1. INTRODUÇÃO

Glicocorticoides são hormônios liberados pelo córtex da glândula adrenal como produto final do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA). Os glicocorticoides naturais principais são o cortisol e a corticosterona para homem e rato, respectivamente. Entretanto, existem também glicocorticoides sintéticos, dentre eles hidrocortisona, betametasona, metilprednisolona e dexametasona.

A Dexametasona (Dex) é um hormônio glicocorticoide sintético, muito usado no tratamento de recém-nascidos prematuros com doença pulmonar crônica (CHOI et al., 2004; DOYLE; EHRENKRANZ; HALLIDAY, 2014a, 2014b). Entretanto, estudos clínicos (HITZERT et al., 2014; SHINWELL et al., 2000; STARK et al., 2001) e experimentais (BHATT et al., 2013; DUKSAL et al., 2009; ICHINOHASHI et al., 2013; MENSCHANOV; BANNOVA; DYGALO, 2014; NEAL et al., 2003; SZE et al., 2013; ZULOAGA et al., 2011) demonstram que glicocorticoides potentes como a Dex podem produzir efeitos adversos no sistema nervoso em desenvolvimento.

A maioria dos artigos presentes na literatura científica demonstram os efeitos cerebrais da Dex sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e morfológicos. Alguns outros estudos, entretanto, mostraram a existência de alterações eletrofisiológicas em animais previamente tratados com Dex, incluindo o aparecimento (DAVIDSON et al., 2011) ou modulação da atividade epileptiforme (YILMAZ et al., 2014). As alterações eletrofisiológicas também incluem a modulação de fenômenos dependentes de plasticidade sináptica como a potenciação de longo prazo (LTP) (KAMPHUIS et al., 2003; LIN; HUANG; HSU, 2006; WANG; HUANG; HSU, 2010).

Postula-se que os efeitos neurais indesejáveis dos glicocorticoides, pelo menos em parte, sejam devido ao estresse oxidativo induzido por esses hormônios (CAMM et al., 2011;

COSTANTINI; MARASCO; MØLLER, 2011; MCINTOSH; HONG; SAPOLSKY, 1998; MCINTOSH; SAPOLSKY, 1996). CAMM et al. (2011) constataram que o tratamento com Dex aumentou o estresse oxidativo no córtex cerebral. Esses autores também observaram que associação deste tratamento com as vitaminas antioxidantes C e E atenua tanto o estresse oxidativo quanto a perda de neurônios induzida pela Dex.

A combinação de Dex com vitaminas antioxidantes no sistema nervoso central em desenvolvimento pode ser estudada através de técnicas eletrofisiológicas como o fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC). A DAC é um modelo de estudo experimental amplamente utilizado no estudo da excitabilidade neuronal (BATISTA-DE-OLIVEIRA, 2012b; LIMA, 2013), relacionado à plasticidade sináptica (SOUZA, 2011) e que vem sendo utilizado para estudar estresse oxidativo (GUEDES; ABADIE-GUEDES; BEZERRA, 2012). Esse fenômeno consiste em uma variação negativa lenta de potencial elétrico, que se propaga de forma concêntrica por todo o tecido neural, acompanhada de alterações neurovasculares. A DAC é deflagrada em resposta a um estímulo de natureza inespecífica de um ponto do tecido cortical, que se recupera na mesma sequência temporo-espacial após 5 a 10 minutos (LEÃO, 1944).

Ao longo dessa introdução serão abordados os seguintes assuntos: [1] a influência dos glicocorticoides, com destaque para a Dex, sobre o sistema nervoso central; [2] como esses hormônios alteram o estado de oxido/redução; [3] o papel das vitaminas antioxidantes nos mecanismos de estresse oxidativo; [4] a utilização da DAC como modelo para avaliar excitabilidade cortical e estresse oxidativo; e [5] como a Dex e as vitaminas antioxidantes C e E se relacionam com a plasticidade sináptica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 GLICOCORTICOIDES E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os glicocorticoides são hormônios naturalmente liberados pelo córtex da adrenal. Em resposta a um estímulo, a liberação de glicocorticoides aumenta como resposta da atividade aumentada do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA). O cortisol e a corticosterona são os principais glicocorticoides naturais, para o homem e para o rato, respectivamente. Eles regulam diversas funções metabólicas, imunológicas e homeostáticas. Esses hormônios exercem um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso como mediadores da proliferação e diferenciação celular (KARST; DE KLOET; JOËLS, 1999). Entretanto, em doses que ultrapassem as fisiológicas, a depender de idade e/ou gênero, podem ter efeitos nocivos (ZULOAGA et al., 2011).

Esses hormônios possuem ação genômica ou rápida (não genômica), através de receptores nucleares e de membrana respectivamente. No sistema nervoso central existem dois tipos de receptores que exercem influência no eixo HHA: 1) receptor para glicocorticoides (GR) e 2) receptor para mineralocorticoides (MR) (DE KLOET; REUL, 1987; DE KLOET et al., 1998). Os glicocorticoides naturais (cortisol e corticosterona) possuem maior afinidade com os MR (DE KLOET et al., 1998); por outro lado, alguns sintéticos (Ex.: dexametasona) possuem maior afinidade com os GR. Diversas estruturas cerebrais expressam esses receptores, principalmente em regiões que fazem parte do sistema límbico, sendo o hipocampo a estrutura cerebral com maior densidade destes (para revisão; MORA et al., 2012). Sabe-se que o estresse prolongado no início da vida, bem como exposição a glicocorticoides exógenos durante o desenvolvimento podem produzir efeitos

prejudiciais de longa duração. Esses efeitos incluem inibição do crescimento somático, atrofia cerebral (DUKSAL, 2009) e desregulação endócrina (BURLET, 2005) com consequente aumento de comportamentos relacionados com ansiedade (KAMPHUIS et al., 2004; LI et al., 2013; NAGANO et al., 2012). O estresse ambiental no início da vida também influencia a expressão e modulação epigenética do gene do GR específico de neurônio no prosencéfalo e no hipocampo (BOSE et al., 2010; MCGOWAN et al., 2009; MEANEY et al., 1996, 2013).

Além dos glicocorticoides naturais supracitados (cortisol e corticosterona), existem hormônios glicocorticoides sintéticos como a dexametasona (**Dex**), metilprednisolona, betametasona e hidrocortisona. Por sua alta afinidade com GR e sua grande potência anti-inflamatória, um dos glicocorticoides sintéticos mais estudados é a Dex. Outro fator que estimula o estudo da Dex durante o desenvolvimento tem sido sua importância clínica na prevenção e tratamento da doença pulmonar crônica em recém-nascidos prematuros (CHOI et al., 2004; DOYLE; EHRENKRANZ; HALLIDAY, 2014a, 2014b) que pode resultar em efeitos indesejáveis no sistema nervoso em desenvolvimento (CHANG et al., 2013; CLAESSENS et al., 2012b; DUKSAL et al., 2009; HUANG et al., 2007; KIM; KIM; CHANG, 2013).

No estudo de STARK et al. (2001), crianças prematuras tratadas com Dex apresentaram menor peso corporal e menor circunferência da cabeça, quando comparadas com prematuros em condições semelhantes, sem tratamento com Dex. Recentemente, HITZERT et al. (2014) observaram alterações motoras, cognitivas e comportamentais em crianças de idade escolar tratadas com Dex durante o período pós-natal. Esses achados clínicos foram evidenciados também em estudos experimentais (FLAGEL et al. 2002; LI et al., 2013; MENSCHANOV et al., 2014; XU et al., 2012).

Um número clinicamente relevante de modelos animais tem sido desenvolvido para investigar os efeitos tardios do tratamento com Dex no sistema nervoso. Estima-se que, com

relação à taxa de crescimento, o cérebro de um filhote de rato próximo ao nascimento é comparável com o de humanos prematuros nascidos entre a semana gestacional 26 e 32 (DOBBING; SANDS, 1979; WHITELAW; THORESEN, 2000). Dadas essas correlações no desenvolvimento, tem sido utilizado o tratamento por três dias com doses gradativamente decrescentes de Dex em filhotes de ratos neonatos do primeiro ao terceiro dia pós-natal (PND1-3) para investigar os efeitos tardios do tratamento com Dex no desenvolvimento cerebral (CAMM et al., 2011; CLAESSENS et al. 2012b; DUKSAL et al., 2009; HUANG et al., 2006; KIM; KIM; CHANG, 2013). Utilizando-se de marcadores moleculares e bioquímicos, DUKSAL et al. (2009) encontraram um maior índice apoptótico no grupo tratado com Dex nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo em comparação ao grupo controle. CLAESSENS et al. (2012b) observaram que filhotes de ratos tratados com esse hormônio sintético durante o período neonatal possuem menor número de células que expressam GFAP, um marcador astrocitário. De modo semelhante, no estudo de UNEMURA et al. (2012), o tratamento com glicocorticoides in vitro por 72h reduziu a proliferação de astrócitos em cultura, bem como a expressão do GR, enquanto que RU486, um antagonista do GR, inibiu a redução tanto da proliferação astrocitária como a expressão do GR. Sabe-se também que a Dex tem ação sobre o processo de mielinização. KIM; KIM; CHANG (2013) observaram redução no conteúdo de mielina cortical e alteração na morfologia de oligodendrócitos de ratos tratados com Dex (0,5 mg/kg de peso corporal) nos três primeiros dias pós-natais. Todas essas evidências demonstram a grande variedade de alterações estruturais e moleculares, no sistema nervoso, associadas à Dex.

Os glicocorticoides podem também agir sobre neurotransmissores cerebrais. Estudos destacam o papel da Dex no sistema noradrenérgico (VÁZQUEZ et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Contudo, mais investigações são necessárias para elucidar esses efeitos, visto que os dados, no sistema noradrenérgico, são contraditórios. Considerando o sistema

serotoninérgico, foi demonstrado que a intervenção com fluoxetina reverte alterações bioquímicas (redução do conteúdo do RNA mensageiro para serotonina e da concentração desse neurotransmissor) e comportamentais (redução na exploração em campo aberto e aumento em respostas indicativas de ansiedade) de ratos expostos a Dex no período neonatal (NAGANO, 2012). A ação da Dex sobre concentração de serotonina cortical, bem como sobre alterações na quantidade de receptor e no transportador para serotonina parece depender do período em que ela é administrada (SLOTKIN et al., 2006).

Esse hormônio sintético também está associado com neurotransmissores excitatórios, como indicado por KAMPHUIS et al. (2003) ao observar que a exposição a Dex durante o desenvolvimento cerebral tem efeitos duradouros sobre a composição e função do complexo receptor de NMDA. As implicações dos glicocorticoides sobre o sistema glutamatérgico serão mais bem discutidas mais adiante (ver 2.5 *AÇÃO DA DEXAMETASONA E DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA E EXCITABILIDADE DO CÓRTEX CEREBRAL*). Entretanto, é importante mencionar que alterações no sistema glutamatérgico podem ser a origem de alguns dos efeitos negativos da Dex através da excitotoxicidade. Além da desregulação no sistema de neurotransmissores excitatórios, também se tem especulado que grande parte dos efeitos adversos do tratamento com glicocorticoides esteja associada ao estresse oxidativo o que será discutido no tópico seguinte.

2.2 GLICOCORTICOIDES E ESTRESSE OXIDATIVO

Evidências sugerem que o tratamento com glicocorticoides aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em culturas de hipocampo e córtex cerebral (MCINTOSH; SAPOLSKY, 1996) e que reduzem a atividade basal de enzimas antioxidantes

cerebrais (MCINTOSH; HONG; SAPOLSKY, 1998). Um estudo de meta-análise (COSTANTINI; MARASCO; MØLLER, 2011) mostrou que em vertebrados há [1] um aumento do estresse oxidativo proporcional à duração do tratamento com glicocorticoides; [2] que tecidos diferentes apresentam distintos níveis de estresse oxidativo; e [3] que o tratamento com glicocorticoides pode resultar em padrões de estresse oxidativo dependentes da idade e do sexo.

Foi previamente demonstrado que a exposição pré-natal a altos níveis de glicocorticoides modificou permanentemente o fenótipo de células neurais de ratos e induziu um aumento na susceptibilidade ao estresse oxidativo (AHLBOM et al., 2000; BOSE et al., 2010; CANLON et al., 2003). SATO et al. (2010) sugeriram que as EROs induzidas por elevados níveis séricos de corticosterona promovem lesões celulares no hipocampo e induzem neurodegeneração, o que resulta em deficiência cognitiva.

Os mecanismos pelos quais os glicocorticoides aumentam a produção de EROS no sistema nervoso central ainda não estão claros; entretanto há algumas suposições para explicar esse aumento de maneira inespecífica. Dentre elas existe a possibilidade de que as EROs sejam produzidas pela enzima mono-amino-oxidase do tipo A (MAO-A), cuja expressão é induzida por glicocorticoides (MANOLI et al., 2005). Adicionalmente, CARLO et al. (1996) mostraram que a Dex aumentou as expressões do mRNA e da quantidade da MAO-B em astrócitos de ratos. Essas alterações foram inibidas pelo inibidor dos receptores para glicocorticoides RU486. O estudo de ARGÜELLES et al. (2010) mostrou um aumento tanto de MAO-A como de MAO-B em animais tratados com Dex, o que reforça a participação dessas enzimas no estresse oxidativo induzido por glicocorticoides.

Por outro lado, outros autores sugerem que a mitocôndria é o principal alvo da Dex e que, desta forma, os glicocorticoides poderiam aumentar a sensibilidade celular ao estresse oxidativo (MUTSAERS; TOFIGHI, 2012). PANDYA et al. (2007) enfatizam que a exposição

repetida a Dex pode significativamente influenciar o metabolismo energético oxidativo da mitocôndria cerebral em animais jovens ou adultos.

2.3 AÇÃO DAS VITAMINAS ANTIOXIDANTES C e E SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO

O termo estresse oxidativo implica em que as EROs excedam a capacidade das células de um determinado órgão em neutralizá-las ou capturá-las. Ou seja, para que o estresse oxidativo ocorra deve haver [1] um aumento nos fatores oxidantes, [2] uma redução dos mecanismos antioxidantes ou [3] ambos (aumento na oxidação e redução na capacidade de neutralização das EROs).

Considerando que o estresse ou a administração de glicocorticoides exógenos no início da vida aumentam o estresse oxidativo (CAMM et al., 2011; SEO et al., 2012; SUWANJANG et al., 2013), estudos clínicos e pré-clínicos têm proposto a terapia antioxidante como forma de minimizar o dano oxidativo oriundo de estresse perinatal (para revisão, consultar MILLER; WALLACE; WALKER, 2012). Estudos em roedores vêm demonstrando que as vitaminas C e E são capazes de minimizar efeitos adversos da Dex sobre os sistemas cardiovascular (HERRERA et al., 2010; NIU et al., 2013) e nervoso (CAMM et al., 2011).

As vitaminas antioxidantes C (ácido ascórbico) e E (tocoferol) são nutrientes essenciais para o homem e são consideradas os antioxidantes mais importantes obtidos através da dieta. Essas vitaminas diferem entre si quanto à solubilidade (vitamina C: hidrossolúvel; vitamina E: lipossolúvel) e quanto à forma de atuação como antioxidante.

As ações antioxidantes da vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) são oriundas da sua capacidade de se incorporar às membranas biológicas para estabilizá-las e protegê-las contra a

peroxidação lipídica (KONTUSH; SCHEKATOLINA, 2004; PACKER; WEBER; RIMBACH, 2001). Por outro lado, as propriedades antioxidantes da vitamina C (ácido ascórbico) surgem da sua atuação como doador de elétrons. Assim, a vitamina C previne que outros agentes se tornem oxidados e conseqüentemente evita uma produção exacerbada de radicais livres (HARRISON; MAY, 2009). A vantagem de se administrar essas duas vitaminas antioxidantes juntas vem do fato de que a vitamina C pode interagir com a vitamina E ligada a membrana reduzindo o *radical* tocoferol de volta à sua *forma molecular*. Esse processo permite que a vitamina E possa atuar novamente como antioxidante.

Entretanto, é necessário cuidado com a dose e com a duração do tratamento antioxidante. A suplementação de vitaminas antioxidantes pode resultar tanto em efeitos benéficos (DEVI; MANJULA; SUBRAMANYAM, 2012; HERRERA; PINEDA; ANTONIO, 2013; HFAIEDH; MURAT; ELFEKI, 2012) quanto deletérios (AYDOĞAN et al., 2008; CHIN; IMA-NIRWANA, 2014).

Os efeitos benéficos das vitaminas antioxidantes são os mais conhecidos e contribuem para que os processos de desenvolvimento e envelhecimento ocorram de forma fisiológica, podendo também prevenir doenças do sistema nervoso central (HARRISON; MAY, 2009; KONTUSH; SCHEKATOLINA, 2004). Estudos demonstram que a administração conjunta de vitaminas C e E parece evitar os danos oxidativos produzidos pelo agrotóxico lindane ou por arsênico em ratos em desenvolvimento (HERRERA; PINEDA; ANTONIO, 2013, HFAIEDH; MURAT; ELFEKI, 2012). De modo semelhante, essas vitaminas são capazes de reverter o estresse oxidativo ocasionado pela exposição de ratos idosos ao frio (DEVI; MANJULA; SUBRAMANYAM, 2012).

Também é conhecido o papel benéfico das vitaminas antioxidantes sobre o comportamento de ansiedade; entretanto, o mecanismo dessa ação ainda não foi elucidado. A redução da ansiedade pelas vitaminas C e E pode ser devido a suas propriedades

antioxidantes, a atenuação da atividade do cortisol ou algum efeito ainda indeterminado em neurotransmissores e em estruturas cerebrais relacionadas com a ansiedade (HUGHES; LOWTHER; VAN NOBELEN, 2011; TERADA et al., 2011). Como essas vitaminas são necessárias para o desenvolvimento cerebral e para o funcionamento neural normal, a deficiência vitamínica também pode produzir alterações cerebrais. PIERCE et al. (2013), por exemplo, encontraram um prejuízo no desempenho motor de camundongos privados de vitaminas C e E. Adicionalmente, EL-BACHÁ; LIMA-FILHO; GUEDES (1998) encontraram alterações eletrofisiológicas de animais alimentados com uma dieta pobre nessas vitaminas.

Também tem se estudado a coadministração de Dex e vitaminas C e E durante o desenvolvimento (CAMM et al., 2011; HERRERA et al., 2010; NIU et al., 2013; WILLIAMS et al., 2012). O estudo de CAMM et al. (2011) constatou que a vitaminas antioxidantes C e E atenuam o estresse oxidativo e a perda de neurônios induzidos no córtex pela Dex. Esse mesmo trabalho sugere que uma terapia combinada de glicocorticoides com vitaminas antioxidantes em neonatos prematuros pode ser mais segura para o desenvolvimento cerebral do que o uso apenas de glicocorticoides.

Apesar de todos os efeitos benéficos das vitaminas, é necessário se ter cautela ao considerar a terapia antioxidante em neonatos, visto que artigos recentes mostram que essas vitaminas podem atuar como pró-oxidantes dependendo da dose, da duração do tratamento ou da idade em que são administradas. A aplicação crônica de vitamina C, por exemplo, na dose de 60 mg/Kg exerceu efeitos pró-oxidante no testículo de ratos (AYDOĞAN et al., 2008) e acelerou propagação da DAC (MONTE-GUEDES, 2011). Com a vitamina E não é diferente: a revisão de CHIN; IMA-NIRWANA (2014) encontrou que o alfa-tocoferol pode exercer efeitos benéficos, prejudiciais ou nulos sobre a formação de células ósseas.

2.4 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL COMO MODELO PARA AVALIAR EXCITABILIDADE CORTICAL E ESTRESSE OXIDATIVO

Os efeitos da coadministração de Dex e vitaminas antioxidantes sobre o sistema nervoso central podem ser estudados através de técnicas eletrofisiológicas, utilizando-se de modelos experimentais como a depressão alastrante cortical (DAC). A DAC foi primeiramente descrita por LEÃO (1944a) como uma onda de depressão da atividade elétrica cortical espontânea, que lentamente se alastra através da superfície do córtex cerebral. Esse fenômeno é deflagrado em resposta à estimulação química, elétrica ou mecânica de um ponto do tecido cortical. É importante ressaltar que, enquanto essa onda de depressão se alastra concentricamente do ponto estimulado em direção a regiões mais remotas, a área inicialmente deprimida começa a se recuperar. A recuperação completa do tecido ocorre após 5-10 minutos, deixando-o pronto para produzir uma nova DAC em resposta a um segundo estímulo. Esse fenômeno é, portanto, completamente reversível (**FIGURA 1**). Concomitante à depressão do eletrocorticograma, ocorre uma variação lenta de voltagem na superfície cortical, tornando-se o ponto sob a ação da DAC mais negativo do que na situação basal (LEAO, 1947). Durante a DAC, têm sido descritas também alterações vasculares (LEÃO, 1944b), e translocações de água e íons (KRAIG; NICHOLSON, 1978; PHILLIPS; NICHOLSON, 1979).

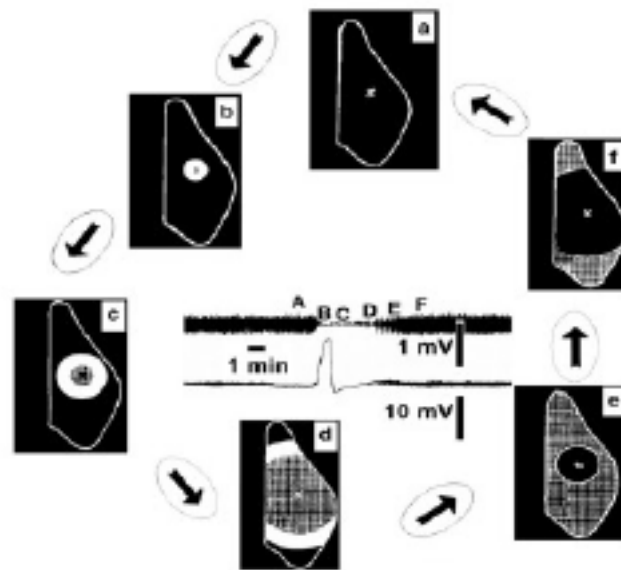


FIGURA 1: Esquema do “ciclo da depressão alastrante cortical” (a-f). No qual, “a” demonstra o córtex normal, “b” o ponto de estimulação marcado com o x (a área branca representa onde está ocorrendo a depressão da atividade elétrica cortical), “c” e “d” mostram a propagação do fenômeno por todo córtex, “e” o início da recuperação do local de estímulo, e em “f” o córtex está quase inteiramente recuperado. (Adaptado de GUEDES, 2011). No centro do diagrama são apresentados: 1) o eletrocorticograma (ECoG; traçado superior), no qual estão marcados, com letras maiúsculas, de “A” a “F”, os momentos representados nos desenhos do córtex, marcados com as respectivas letras minúsculas; 2) a variação lenta de voltagem (traçado inferior), que ocorre no ponto cortical sob a DAC, simultaneamente à depressão do ECoG.

Já foi demonstrado que diversos fatores são capazes de alterar a velocidade de propagação da DAC, sejam eles hormonais, nutricionais, farmacológicos ou ambientais. A **TABELA 1** lista alguns fatores que dificultam a propagação da DAC. A **TABELA 2** contém alguns que aceleram esse fenômeno.

TABELA 1. Algumas condições que dificultam a propagação da DAC

<i>Condição experimental</i>	<i>Autor/Ano</i>
Tratamento dietético com lítio	GUEDES et al., 1989
Hiperglicemia	COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006; XIMENES-DA-SILVA; GUEDES, 1991
Anestésicos	GUEDES; BARRETO, 1992
Hipotireoidismo	GUEDES; PEREIRA-DA-SILVA, 1993
Envelhecimento	GUEDES; AMORIM; TEODÓSIO, 1996
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006; GUEDES; CAVALHEIRO, 1997
Estimulação ambiental	SANTOS-MONTEIRO et al., 2000
Ativação do sistema serotoninérgico	GUEDES et al., 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006
Estimulação elétrica cerebral direta e trans-craniana	FREGNI et al., 2005, 2007
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Dieta hiperlipídica	PAIXÃO et al., 2007
Tratamento com triptofano (precursor da serotonina)	TRINDADE-FILHO et al, 2009
Deficiência, na dieta, de ácidos graxos essenciais	BORBA et al., 2010
Abolição da função ovariana (castração) no início da vida	ACCIOLY et al., 2012
Tratamento com o antagonista opioide Naloxona	GUEDES et al., 2013

TABELA 2: Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

<i>Condição experimental</i>	<i>Autor/Ano</i>
Redução do cloreto extracelular	GUEDES; DO CARMO, 1980
Privação do sono paradoxal	DE VASCONCELOS et al., 2004
Diazepam	GUEDES et al., 1992
Etanol	ABADIE-GUEDES et al., 2008; GUEDES; FRADE, 1993
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997
Hipertireoidismo	SANTOS, 2000
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001
Privação sensorial	TENÓRIO et al, 2009
Arginina durante o desenvolvimento	MAIA et al., 2009
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS et al., 2009
Glutamina durante o desenvolvimento	LIMA et al., 2009
Uso de dipirona no início da vida	AMARAL et al., 2009
Tratamento crônico com 60mg/kg de ác. ascórbico	MONTE-GUEDES et al., 2011
Tratamento com o antagonista serotoninérgico tianeptina	AMANCIO-DOS-SANTOS et al., 2013
Glutamato monossódico	LIMA et al., 2013, 2014

*Dieta Básica Regional

Esse fenômeno tem sido associado a diversas doenças do sistema nervoso, como a epilepsia (DREIER et l., 2012), enxaqueca com aura (NOSEDA; BURSTEIN, 2013), trauma encefálico (TORRENTE et al., 2014a) e doenças vasculares cerebrais (DREIER, 2011). A fim

de destacar a influência da DAC sobre a excitabilidade cortical, aqui, será dada ênfase na sua relação com a Epilepsia.

Muitas das características desse fenômeno são similares à atividade observada durante episódios de crise epilética (GORJI, 2001; SOMJEN, 2001). Foi demonstrado que a DAC aumenta a excitabilidade cerebral e facilita a sincronização de descargas neuronais na presença de desinibição parcial desse tecido através da bicuculina, antagonista do Ácido Gama Amino-butírico (GABA) (EICKHOFF et al., 2014). Os potenciais de campo epileptiformes também podem preceder a DAC em modelos *in vitro* de epilepsia, em fatias de cérebros humanos e de roedores, induzida pela estimulação elétrica ou pela redução do magnésio extracelular (MODY; LAMBERT; HEINEMANN, 1987; AVOLI et al., 1991; GORJI et al., 2001). Similarmente, potenciais ictais foram observados antes da DAC em pacientes com lesão cerebral aguda (FABRICIUS et al., 2008). Além disso, a DAC pode ser deflagrada em uma área sensibilizada por uma única descarga de foco epilético (KOROLEVA; BURES, 1983) e DACs repetitivas podem aumentar atividades epiléticas (GORJI; SPECKMANN, 2004) provavelmente pela supressão seletiva da função GABAérgica (KRUGER; LUHMANN; HEINEMANN, 1996).

A influência da DAC sobre a excitabilidade cortical também já foi evidenciada em estudos experimentais através de alterações em sistemas de neurotransmissores excitatórios (MARRANNES et al., 1988) ou inibitórios (BURES; VON SCHWARZENFELD; BORZEK, 1975; GUEDES; CAVALHEIRO, 1997). Efeito semelhante pode também ser obtido por meio de alterações induzidas por outros tratamentos que sabidamente modificam a excitabilidade cortical, tais como estimulação transcraniana (FREGNI et al., 2005, 2007) e periférica (MONTE-SILVA et al., 2007). Outro fator importante é a capacidade que a DAC tem de induzir potenciação da atividade elétrica cerebral semelhante a potenciação de longo prazo (LTP). A LTP consiste em um aumento da força de transmissão sináptica de maneira

duradoura e é um dos mecanismos basais da plasticidade sináptica. Este assunto será mais bem discutido no tópico seguinte (ver 2.5 *AÇÃO DA DEXAMETASONA E DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA E EXCITABILIDADE DO CÓRTEX CEREBRAL*).

Apesar de a DAC ser mais utilizada para avaliar alterações na excitabilidade do tecido neural, vários trabalhos têm associado esse fenômeno com processos envolvendo oxidação e/ou fatores antioxidantes no cérebro (GUEDES; ABADIE-GUEDES; BEZERRA, 2012). De modo geral, fatores que aumentam o estresse oxidativo também aceleram a propagação da DAC. Em contrapartida, fatores antioxidantes reduzem a velocidade de propagação da DAC (ABADIE-GUEDES et al., 2008).

Sabe-se que a deficiência dietética das vitaminas C e E facilita a propagação da DAC (EL-BACHÁ; LIMA-FILHO; GUEDES, 1998). Da mesma forma, a administração crônica de álcool etílico, que aumenta a quantidade de EROs, acelera a DAC. Esse efeito foi revertido pelo tratamento com o antioxidante astaxantina. (ABADIE-GUEDES; GUEDES; BEZERRA, 2008). Em outro estudo, a aplicação crônica de vitamina C em uma dose considerada pró-oxidante (AYDOĞAN et al., 2008) foi associada à facilitação da DAC no córtex cerebral de ratos recém-desmamados (MONTE-GUEDES et al., 2011). O melhor entendimento do papel das vitaminas antioxidantes sobre a DAC pode nos fornecer informações importantes sobre seus mecanismos basais no cérebro, os quais ainda não são claros. O estudo do efeito da administração de Dex associada a vitaminas antioxidantes sobre a DAC se enquadra nessa nova tendência de estudos.

Além disso, a investigação da ação hormonal sobre a DAC faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT/ UFPE). Já foram estudados os efeitos dos hormônios tireoidianos (GUEDES, PEREIRA-DA-SILVA, 1993), da insulina (COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001), bem como a influência da ovariectomia

sobre as características da DAC (ACCIOLY et al., 2012). Atualmente estão em andamento, neste mesmo laboratório, pesquisas que tem como objetivo verificar a ação da suplementação de hormônios gonadais femininos (estrógeno e progesterona) e masculino (testosterona) sobre este mesmo fenômeno.

2.5 AÇÃO DA DEXAMETASONA E DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES SOBRE A PLASTICIDADE SINÁPTICA E EXCITABILIDADE DO CÓRTEX CEREBRAL

Evidências *in vitro* (FOOTITT; NEWBERRY, 1998; GORJI et al., 2004) e *in vivo* (SOUZA et al., 2011; Guedes et al., 2005) indicam que a atividade elétrica cerebral é potencializada após a DAC. Essa potenciação da atividade elétrica cortical *in vivo*, associada à DAC, pode ser modulada de acordo com o estado nutricional do animal durante o período neonatal (SOUZA et al., 2011).

Tem sido estudada a influência da Dex sobre a função sináptica através da técnica eletrofisiológica da LTP. Foi observado que a administração de Dex no período neonatal em ratos dificulta a LTP induzida pela estimulação tetânica em fatias de hipocampo (HUANG et al., 2007; WANG; HUANG; HSU, 2010). Inibidores de receptor para glicocorticoides (GR), mas não de receptores para mineralocorticoides (MR), bloqueiam os efeitos da Dex sobre a plasticidade sináptica. Ou seja, a ação da Dex sobre a plasticidade sináptica parece ser via GR. Condições favoráveis de lactação (amamentação em ninhadas de tamanho pequeno – com apenas 3 filhotes) parecem minimizar os efeitos da Dex sobre a LTP (WANG; HUANG; HSU, 2010). Outro fator que também parece reduzir tais efeitos é o manuseio (handling) dos filhotes tratados com Dex (CLAESSENS et al., 2012a).

Assim como a administração neonatal de Dex, as vitaminas antioxidantes também podem interferir na LTP, porém com efeitos opostos. Enquanto que a Dex no início da vida inibe a LTP, a vitamina E a facilita (XIE; SASTRY, 1993). Adicionalmente, em ratos que receberam dieta deficiente em vitamina E houve dificuldade em produzir LTP (XIE; SASTRY, 1995), o que demonstra um efeito dicotômico. Também já foi demonstrado que o alfa tocoferol atenua tanto a deficiência em produzir LTP em ratos idosos, como o estresse oxidativo induzido pela idade (MURRAY; LYNCH, 1998). Quanto à vitamina C, não foram encontrados na literatura efeitos relacionados à plasticidade sináptica.

A LTP é um fenômeno relacionado à excitabilidade neuronal. Neste sentido, é importante destacar a importância dos neurotransmissores para essa excitabilidade. O glutamato, por exemplo, é um neurotransmissor excitatório que compartilha um relacionamento íntimo com os glicocorticoides: [1] glicocorticoides podem aumentar a vulnerabilidade de células hipocâmpais para ativação de receptor para glutamato (GluR) (ARMANINI et al., 1990); [2] ativação de GR leva a regulação para cima da expressão de um tipo de GluR, o NMDAR ionotrópico, fortemente associado a neurotoxicidade (WEILAND; ORCHINIK; TANAPAT, 1997); [3] níveis elevados de glicocorticoides têm sido associados com um aumento na transmissão glutamatérgica (MOGHADDAM et al., 1994) e [4] o glutamato pode aumentar a ativação de GR (GURSOY; CARDOUNEL; KALIMI, 2001). Além disso, LU et al. (2003) mostraram que os GluR mediam os efeitos neurotóxicos dos glicocorticoides nas células do hipocampo. Diante do exposto acima, é razoável supor que os glicocorticoides poderiam modular a excitabilidade neuronal através da via glutamatérgica.

Ainda, os hormônios esteroides desempenham um papel chave no controle neuroendócrino da excitabilidade cortical e susceptibilidade a convulsões (para revisão, consultar REDDY, 2013). O tratamento pré-natal com Dex foi relacionado ao surgimento de ondas epileptiformes, cuja aparência, duração e evolução estereotípica se assemelham às

encontradas em crises epilépticas em filhotes de ovelhas, nascidos prematuramente (DAVIDSON et al., 2011). Por outro lado, Dex pode efetivamente diminuir a atividade epileptiforme induzida por pilocarpina em ratos adultos (Yilmaz et al., 2014).

A partir da presente fundamentação teórica, este trabalho teve os objetivos enumerados a seguir.

3. HIPÓTESE

O tratamento neonatal com dexametasona (Dex) altera parâmetros associados a depressão alastrante cortical (DAC). A associação deste tratamento com vitaminas antioxidante C e E minimizam ou reverterem as alterações induzidas pela dexametasona.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar em ratos albinos desenvolvidos (60-70 dias de idade) os efeitos do tratamento precoce (1-6 dias de idade) com dexametasona (Dex), combinada à administração das vitaminas antioxidantes C e E, sobre a depressão alastrante cortical (DAC).

4.2. Específicos

- Acompanhar a evolução do peso corporal durante o período de experimentação, como indicador do desenvolvimento corporal;
- Investigar se a administração de Dex no período neonatal altera parâmetros eletrofisiológicos cerebrais avaliados por meio da DAC;
- Averiguar se os efeitos produzidos pela administração de Dex podem ser revertidos ou minimizados em consequência da associação com a administração das vitaminas antioxidantes C e E;
- Nas condições de tratamento com Dex e/ou vitaminas C e E, acima descritas, avaliar como se comporta a potenciação do eletrocorticograma associada à DAC, em comparação com a potenciação que ocorre em condições controle.

5. REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES, R. et al. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 32, n. 8, p. 1417–21, ago. 2008.

ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R. C. A; BEZERRA, R. S. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 36, n. 9, p. 1563–7, set. 2012.

ACCIOLY, N. E. et al. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International journal of developmental neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 405–10, ago. 2012.

AHLBOM, E. et al. Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14726–30, 19 dez. 2000.

ALSHUAIB, W. B.; MATHEW, M. V. Vitamins C and E modulate neuronal potassium currents. **The Journal of membrane biology**, v. 210, n. 3, p. 193–8, abr. 2006.

AMANCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European journal of pharmacology**, v. 706, n. 1-3, p. 70–5, 15 abr. 2013.

AMARAL, A. P. B. et al. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. **Experimental neurology**, v. 219, n. 2, p. 492–8, out. 2009.

ARGÜELLES, S. et al. Degeneration of dopaminergic neurons induced by thrombin injection in the substantia nigra of the rat is enhanced by dexamethasone: role of monoamine oxidase enzyme. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 1, p. 55–66, jan. 2010.

ARMANINI, M. P. et al. Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent. **Brain research**, v. 532, n. 1-2, p. 7–12, 5 nov. 1990.

AVOLI M. et al. Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. **Annals of Neurology**, v. 30, p. 589–596, 1991.

AYDOĞAN, M. et al. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. **Toxicology**, v. 249, n. 1, p. 35–9, 10 jul. 2008.

BARKS, J. D.; POST, M.; TUOR, U. I. Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. **Pediatric research**, v. 29, n. 6, p. 558–63, jun. 1991.

BARRINGTON, K. J. The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. **BMC pediatrics**, v. 1, p. 1, jan. 2001.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M. et al. Favorable and unfavorable lactation modulates the effects of electrical stimulation on brain excitability: a spreading depression study in adult rats. **Life sciences**, v. 91, n. 9-10, p. 306–11, 24 set. 2012.

BERTORELLI, R. et al. MK 801 and dexamethasone reduce both tumor necrosis factor levels and infarct volume after focal cerebral ischemia in the rat brain. **Neuroscience letters**, v. 246, n. 1, p. 41–4, 17 abr. 1998.

BHATT, A. J. et al. Dexamethasone induces apoptosis of progenitor cells in the subventricular zone and dentate gyrus of developing rat brain. **Journal of neuroscience research**, v. 91, n. 9, p. 1191–202, set. 2013.

BORBA, J. M. C. et al. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 144–50, jun. 2010.

BOSE, R. et al. Glucocorticoids induce long-lasting effects in neural stem cells resulting in senescence-related alterations. **Cell death & disease**, v. 1, n. 11, p. e92, jan. 2010.

BURES, J.; VON SCHWARZENFELD, I.; BORZEK, G. Blockage of cortical spreading depression by picrotoxin foci of paroxysmal activity. **Epilepsia**, v. 16, n. 1, p. 111–8, mar. 1975.

BURLET, G. et al. Antenatal glucocorticoids blunt the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of neonates and disturb some behaviors in juveniles. **Neuroscience**, v. 133, n. 1, p. 221–30, jan. 2005.

CAMM, E. J. et al. Oxidative stress in the developing brain: effects of postnatal glucocorticoid therapy and antioxidants in the rat. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21142, jan. 2011.

CANLON, B. et al. Alterations in the intrauterine environment by glucocorticoids modifies the developmental programme of the auditory system. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 2035–2041, maio 2003.

CARLO, P. et al. Monoamine oxidase B expression is selectively regulated by dexamethasone in cultured rat astrocytes. **Brain research**, v. 711, n. 1-2, p. 175–83, 4 mar. 1996.

CHANG, K.-H. et al. Neonatal dexamethasone treatment exacerbates hypoxic-ischemic brain injury. **Molecular brain**, v. 6, p. 18, jan. 2013.

CHIN, K.-Y.; IMA-NIRWANA, S. The effects of α -tocopherol on bone: a double-edged sword? **Nutrients**, v. 6, n. 4, p. 1424–41, abr. 2014.

CHOI, C. W. et al. Decreasing incidence of chronic lung disease despite the gradual reduction of postnatal dexamethasone use in very low birth weight infants. **Journal of Korean medical science**, v. 19, n. 4, p. 514–8, ago. 2004.

CLAESSENS, S. E. F. et al. Early handling modulates outcome of neonatal dexamethasone exposure. **Hormones and behavior**, v. 62, n. 4, p. 433–41, set. 2012a.

CLAESSENS, S. E. F. et al. Acute effects of neonatal dexamethasone treatment on proliferation and astrocyte immunoreactivity in hippocampus and corpus callosum: towards a rescue strategy. **Brain research**, v. 1482, p. 1–12, 30 out. 2012b.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R. C. A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience letters**, v. 401, n. 3, p. 271–5, 3 jul. 2006.

COSTA-CRUZ, R. R.; GUEDES, R. C. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience letters**, v. 303, n. 3, p. 177–80, 11 maio 2001.

COSTANTINI, D.; MARASCO, V.; MØLLER, A. P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. **Journal of comparative physiology**, v. 181, n. 4, p. 447–56, maio 2011.

CRAIG, A. et al. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. **Experimental neurology**, v. 181, p. 231–240, 2003.

DARDZINSKI, B. J. et al. Increased plasma beta-hydroxybutyrate, preserved cerebral energy metabolism, and amelioration of brain damage during neonatal hypoxia ischemia with dexamethasone pretreatment. **Pediatric research**, v. 48, n. 2, p. 248–55, ago. 2000.

DAVIDSON, J. O. et al. Maternal dexamethasone and EEG hyperactivity in preterm fetal sheep. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 15, p. 3823–35, 1 ago. 2011.

DE KLOET, E. R. et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 269–301, 1998.

DE KLOET, E. R.; REUL, J. M. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, n. 2, p. 83–105, jan. 1987.

DEAN, J. M. et al. Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. **Developmental neuroscience**, v. 33, n. 3-4, p. 251–60, jan. 2011a.

DEAN, J. M. et al. An organotypic slice culture model of chronic white matter injury with maturation arrest of oligodendrocyte progenitors. **Molecular neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 46, jan. 2011b.

DESGENT, S. et al. Early-life stress is associated with gender-based vulnerability to epileptogenesis in rat pups. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42622, jan. 2012.

DEVI, S. A.; MANJULA, K. R.; SUBRAMANYAM, M. V. V. Protective role of vitamins E and C against oxidative stress caused by intermittent cold exposure in aging rat's frontoparietal cortex. **Neuroscience letters**, v. 529, n. 2, p. 155–60, 7 nov. 2012.

DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early human development**, v. 3, n. 1, p. 79–83, mar. 1979.

DOYLE, L. W.; EHRENKRANZ, R. A.; HALLIDAY, H. L. Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 5, p. CD001146, jan. 2014a.

DOYLE, L. W.; EHRENKRANZ, R. A.; HALLIDAY, H. L. Late (> 7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 5, p. CD001145, 13 maio 2014b.

DREIER, J. P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 4, p. 439–47, abr. 2011.

DUKSAL, F. et al. Effects of different corticosteroids on the brain weight and hippocampal neuronal loss in rats. **Brain research**, v. 1250, p. 75–80, 23 jan. 2009.

EICKHOFF, M. et al. Spreading depression triggers ictal activity in partially disinhibited neuronal tissues. **Experimental neurology**, v. 253C, p. 1–15, 22 dez. 2013.

EL-BACHÁ, R. S.; LIMA-FILHO, J. L.; GUEDES, R. C. A. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n.3, p. 205-212. 1998.

FABRICIUS, M. et al. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, p. 1973–1984, 2008.

FARIAS-SANTOS, R. D. C. et al. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. **Neuroscience letters**, v. 454, n. 3, p. 218–22, 1 maio 2009.

FENG, Y.; RHODES, P. G.; BHATT, A. J. Dexamethasone pre-treatment protects brain against hypoxic-ischemic injury partially through up-regulation of vascular endothelial growth factor A in neonatal rats. **Neuroscience**, v. 179, p. 223–32, 14 abr. 2011.

FLAGEL, S. B. et al. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. **American Journal of Physiology**, v. 282, n. 1, p. R55–63, jan. 2002.

FOOTITT, D. R.; NEWBERRY, N. R. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. **Brain research**, v. 781, n. 1-2, p. 339–42, 19 jan. 1998.

FREGNI, F. et al. Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation. **The European journal of neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 2278–84, abr. 2005.

FREGNI, F. et al. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. **Experimental neurology**, v. 204, n. 1, p. 462–6, mar. 2007.

GORJI, A. et al. Spinal and cortical spreading depression enhance spinal cord activity. **Neurobiology of Disease**, v. 15, n. 1, p. 70–79, fev. 2004.

GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Review**, v. 38, p. 33–60, 2001.

GUEDES, R. C. et al. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 22, n. 7, p. 923–5, jan. 1989.

GUEDES, R. C. A.; ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R. D. S. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. **Nutritional neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 111–9, maio 2012.

GUEDES, R. C. A. et al. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 115–23, abr. 2002.

GUEDES, R. C. A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; MARTIN, C. R. (Eds.). **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. New York, NY: Springer, 2011. p. 2343–2354.

GUEDES, R. C. A. et al. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 142–6, jul. 2013.

GUEDES, R. C.; AMORIM, L. F.; TEODÓSIO, N. R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, n. 10, p. 1407–12, out. 1996.

GUEDES, R. C.; BARRETO, J. M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 25, n. 4, p. 393–7, jan. 1992.

GUEDES, R. C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; TEODÓSIO, N. R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats. In: Do Carmo, R.J. (Ed.), Spreading Depression. In: **Experimental Brain Research**, series 23. Springer, Berlin, p.17–26, 1992.

GUEDES, R. C.; CAVALHEIRO, E. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy research**, v. 27, n. 1, p. 33–40, abr. 1997.

GUEDES, R. C.; DO CARMO, R. J. Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental brain research**, v. 39, n. 3, p. 341–9, jan. 1980.

GUEDES, R. C.; FRADE, S. F. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 26, n. 11, p. 1241–4, nov. 1993.

GUEDES, R. C.; PEREIRA-DA-SILVA, M. S. Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 26, n. 10, p. 1123–8, out. 1993.

GURSOY, E.; CARDOUNEL, A.; KALIMI, M. Heat shock preconditioning and pretreatment with glucocorticoid antagonist RU 486 protect rat myogenic cells H9c2 against glutamate-induced cell death. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 220, n. 1–2, p. 25–30, abr. 2001.

HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free radical biology & medicine**, v. 46, n. 6, p. 719–30, 15 mar. 2009.

HERRERA, A.; PINEDA, J.; ANTONIO, M. T. Toxic effects of perinatal arsenic exposure on the brain of developing rats and the beneficial role of natural antioxidants. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 73–9, jul. 2013.

HERRERA, E. A et al. Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9250, jan. 2010.

HFAIEDH, N.; MURAT, J.; ELFEKI, A. A combination of ascorbic acid and α -tocopherol or a combination of Mg and Zn are both able to reduce the adverse effects of lindane-poisoning on rat brain and liver. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 26, n. 4, p. 273–8, out. 2012.

HITZERT, M. M. et al. Functional outcome at school age of preterm-born children treated with high-dose dexamethasone. **Early human development**, p. 1–6, 3 mar. 2014.

HOLSAPPLE, M. P.; WEST, L. J.; LANDRETH, K. S. Species comparison of anatomical and functional immune system development. **Birth defects research**, v. 68, n. 4, p. 321–34, ago. 2003.

HUANG, C. et al. Effects of Neonatal Corticosteroid Treatment on Hippocampal Synaptic Function. **Pediatric Research**, v. 62, n. 3, p. 267–270, 2007.

HUGHES, R. N.; LOWTHER, C. L.; VAN NOBELEN, M. Prolonged treatment with vitamins C and E separately and together decreases anxiety-related open-field behavior and acoustic startle in hooded rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 97, n. 3, p. 494–9, jan. 2011.

ICHINOHASHI, Y. et al. Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses. **Early human development**, v. 89, n. 5, p. 283–8, maio 2013.

IKEDA, T. et al. Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. **Behavioural brain research**, v. 136, n. 1, p. 161–70, 17 out. 2002.

KAMPHUIS, P. J. G. H. et al. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: involvement of the NMDA receptor complex. **The FASEB journal**, v. 17, n. 8, maio 2003.

KAMPHUIS, P. J. G. H. et al. Neonatal dexamethasone treatment affects social behaviour of rats in later life. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 461–474, 2004.

KARST, H.; DE KLOET, E. R.; JOËLS, M. Episodic corticosterone treatment accelerates kindling epileptogenesis and triggers long-term changes in hippocampal CA1 cells, in the fully kindled state. **The European journal of neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 889–98, mar. 1999.

KIM, J.-W.; KIM, Y. J.; CHANG, Y. P. Administration of dexamethasone to neonatal rats induces hypomyelination and changes in the morphology of oligodendrocyte precursors. **Comparative medicine**, v. 63, n. 1, p. 48–54, fev. 2013.

KONTUSH, K.; SCHEKATOLINA, S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1031, p. 249–62, dez. 2004.

KOROLEVA, V. I.; BURES, J. Blockade of cortical spreading depression in electrically and chemically stimulated areas of cerebral cortex in rats. **Electroencephalographic Clinical Neurophysiology**, v. 48, p. 1-15, 1980

KRAIG, R. P.; NICHOLSON, C. Extracellular ionic variations during spreading depression. **Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 1045–59, jan. 1978.

KRUGER H.; LUHMANN H. J.; HEINEMANN U. Repetitive spreading depression causes selective suppression of GABAergic function. **Neuroreport**, v. 7, p. 2733–2736, 1996.

KUMAR, G. et al. Early life stress enhancement of limbic epileptogenesis in adult rats: mechanistic insights. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24033, jan. 2011.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, n. 6, p. 359–390, 1944a.

LEÃO, A. A. P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of neurophysiology**, v. 10, n. 6, p. 409–14, nov. 1947.

LEÃO, A. A. P. Pial circulation and spreading depression of activity in cerebral cortex **Journal of Neurophysiology**, v. 7, n. 6, p. 391–396, 1944b.

LEI, L. et al. Dexamethasone induced changes of neural activity in the auditory cortex of rats. **Neuroscience research**, 16 jan. 2014.

LI, S. et al. Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. **Neurobiology of disease**, v. 62C, p. 124–134, 17 set. 2014.

LIMA, D. S. C. et al. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life sciences**, v. 85, n. 5-6, p. 241–7, 31 jul. 2009.

LIMA, C. B. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. **Life sciences**, v. 93, n. 9-11, p. 388–92, 17 set. 2013.

LIMA, C. B. et al. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 98–105, abr. 2014.

LIN, H.-J.; HUANG, C.-C.; HSU, K.-S. Effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. **Annals of neurology**, v. 59, n. 6, p. 939–51, jun. 2006.

LODYGENSKY, G. A et al. Neuroimaging of cortical development and brain connectivity in human newborns and animal models. **Journal of anatomy**, v. 217, n. 4, p. 418–28, out. 2010.

LU, J. et al. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-d-aspartate receptors. **Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 123–131, set. 2003.

MAIA, L. M. S. S. et al. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. **Nutritional neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73–80, abr. 2009.

MANOLI, I. et al. Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. **The FASEB journal**, v. 19, n. 10, p. 1359–61, ago. 2005.

MARRANNES, R. et al. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. **Brain research**, v. 457, n. 2, p. 226–40, 9 ago. 1988.

MCGOWAN, P. O. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342–8, mar. 2009.

MCINTOSH, L. J.; HONG, K. E.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. **Brain research**, v. 791, n. 1-2, p. 209–14, 27 abr. 1998.

MCINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Experimental neurology**, v. 141, n. 2, p. 201–6, out. 1996.

MEANEY, M. J. et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. **Developmental neuroscience**, v. 18, n. 1-2, p. 49–72, jan. 1996.

MEANEY, M. J. et al. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. **Behavioral neuroscience**, v. 127, n. 5, p. 637–41, out. 2013.

MENSHANOV, P. N.; BANNOVA, A. V.; DYGALO, N. N. Dexamethasone suppresses the locomotor response of neonatal rats to novel environment. **Behavioural brain research**, v. 271C, p. 43–50, 2 jun. 2014.

MILLER, S. L.; WALLACE, E. M.; WALKER, D. W. Antioxidant therapies: a potential role in perinatal medicine. **Neuroendocrinology**, v. 96, n. 1, p. 13–23, jan. 2012.

MODY, I.; LAMBERT, J. D.; HEINEMANN, U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 57, p. 869–888, 1987.

MOGHADDAM, B. et al. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. **Brain research**, v. 655, n. 1-2, p. 251–4, 29 ago. 1994.

MONTE-GUEDES, C. K. R. et al. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. **Neuroscience letters**, v. 496, n. 3, p. 191–4, 8 jun. 2011.

MONTE-SILVA, K. K. DO et al. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 187–194, jun. 2007.

MORA, F. et al. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. **Brain research**, v. 1476, p. 71–85, 2 out. 2012.

MURRAY, C. A.; LYNCH, M. A. Dietary Supplementation with Vitamin E Reverses the Age-related Deficit in Long Term Potentiation in Dentate Gyrus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12161–12168, 15 maio 1998.

MUTSAERS, H. A M.; TOFIGHI, R. Dexamethasone enhances oxidative stress-induced cell death in murine neural stem cells. **Neurotoxicity research**, v. 22, n. 2, p. 127–37, ago. 2012.

NAGANO, M. et al. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 2, p. 292–300, ago. 2012.

NEAL, C. R. et al. Dexamethasone exposure during the neonatal period alters ORL1 mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and hippocampus of the adult rat. **Developmental Brain Research**, v. 146, n. 1-2, p. 15–24, dez. 2003.

NIU, Y. et al. Antioxidant treatment improves neonatal survival and prevents impaired cardiac function at adulthood following neonatal glucocorticoid therapy. **The Journal of physiology**, v. 591, n. Pt 20, p. 5083–93, 15 out. 2013.

O'SHEA, T. M. et al. Randomized placebo-controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age. **Pediatrics**, v. 104, n. 1 Pt 1, p. 15–21, jul. 1999.

PACKER, L.; WEBER, S. U.; RIMBACH, G. Molecular Aspects of Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 369–373, 2001.

PAIXÃO, A. et al. Impact of two early malnutrition models on renal and neural functions in rats. In: VESLER, L. W. (Ed.). **Malnutrition in the 21st Century**. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2007. p. 239–63.

PANDYA, J. D.; AGARWAL, N. A; KATYARE, S. S. Dexamethasone treatment differentially affects the oxidative energy metabolism of rat brain mitochondria in developing and adult animals. **International journal of developmental neuroscience**, v. 25, n. 5, p. 309–16, ago. 2007.

PHILLIPS, J. M.; NICHOLSON, C. Anion permeability in spreading depression investigated with ion-sensitive microelectrodes. **Brain research**, v. 173, n. 3, p. 567–71, 21 set. 1979.

PIERCE, M. R. et al. Combined vitamin C and E deficiency induces motor defects in gulo(-)/SVCT2(+/-) mice. **Nutritional neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 160–73, jul. 2013.

REDDY, D. S. Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. July, p. 115, jan. 2013.

ROCHA-DE-MELO, A. P. et al. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional neuroscience**, v. 9, n. 3-4, p. 155–60, 2006.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES, R. C. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 5, p. 663–9, maio 1997.

ROSE, R. P.; MORELL, F.; HOEPPNER, T. J. Influences of pituitary-adrenal hormones on kindling. **Brain research**, v. 169, p. 303–315, 1979.

SANTOS, R. S. et al. Nutrição, hipertiroidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados. **Mestrado UFPE Março/1998 – dezembro/2000**. Dissertação defendida em 12 / dezembro / 2000.

SATO, H. et al. Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 47, n. November, p. 224–232, 2010.

SEO, J.-S. et al. NADPH oxidase mediates depressive behavior induced by chronic stress in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9690–9, 11 jul. 2012.

SHINWELL, E. S. et al. Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 83, n. 3, p. F177–81, nov. 2000.

SLOTKIN, T. A. et al. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 5, p. 904–911, 2006.

SOMJEN G. G. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. **Physiological Review**, v. 81, n. 3, p. 1065-1096, 2001

SOUZA, T. K. M. et al. Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats. **Experimental brain research**, v. 214, n. 3, p. 463–9, out. 2011.

STARK, A. R. et al. Adverse effects of early dexamethasone treatment in extremely-low-birth-weight infants. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 2, p. 95–101, 2001.

SUWANJANG, W. et al. Melatonin attenuates dexamethasone toxicity-induced oxidative stress, calpain and caspase activation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, p. 1–7, 17 maio 2013.

SZE, C. et al. The Role of Glucocorticoid Receptors in Dexamethasone-Induced Apoptosis of Neuroprogenitor Cells in the Hippocampus of Rat Pups. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 628094, 2013.

TAHER, T. R. et al. Chronic low-dose corticosterone supplementation enhances acquired epileptogenesis in the rat amygdala kindling model of TLE. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 9, p. 1610–6, set. 2005.

TENÓRIO, A. DA S. et al. Lasting facilitatory effects of neonatal vibrissae removal on the propagation of cortical spreading depression: an electrophysiological study in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 281–8, dez. 2009.

TERADA, Y. et al. Dietary Vitamin E Deficiency Increases Anxiety-Like Behavior in Juvenile and Adult Rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1894–1899, 2011.

TORRENTE, D. et al. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? **Neuroscience letters**, v. 565, p. 2–6, 17 abr. 2014.

TRINDADE-FILHO, E. M., VASCONCELOS, C. A. C., GUEDES, R. C. A. Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in REM sleep deprived and non-deprived adult rats. **Psychological. Neuroscience**. v. 2, p. 235–241, 2009.

UNEMURA, K. et al. Glucocorticoids Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression In Vitro and In Vivo. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 30–39, 2012.

VANNUCCI, R. C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. **American journal of perinatology**, v. 17, n. 3, p. 113–20, jan. 2000.

VASCONCELOS, C. A. C. et al. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**. v. 7, p. 163–170, 2004

VÁZQUEZ, D. M. et al. Regulation of corticoid and serotonin receptor brain system following early life exposure of glucocorticoids: long term implications for the neurobiology of mood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 3, p. 421–37, mar. 2012.

WANG, Y.; HUANG, C.; HSU, K. The role of growth retardation in lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. **PloS one**, v. 5, n. 9, p. e12806, jan. 2010.

WEICHSEL, M. E. The therapeutic use of glucocorticoid hormones in the perinatal period: potential neurological hazards. **Annals of neurology**, v. 2, n. 5, p. 364–6, nov. 1977.

WEILAND, N. G.; ORCHINIK, M.; TANAPAT, P. Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 78, n. 3, p. 653–62, jun. 1997.

WHITELAW, A.; THORESEN, M. Antenatal steroids and the developing brain. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 83, n. 2, p. F154–7, set. 2000.

WILLIAMS, D. B. et al. Dietary supplementation with vitamin E and C attenuates dexamethasone-induced glucose intolerance in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 302, n. 1, p. R49–58, 1 jan. 2012.

XIE, Z.; SASTRY, B. R. Induction of hippocampal long-term potentiation by α -tocopherol. **Brain Research**, v. 604, n. 1-2, p. 173–179, fev. 1993.

XIE, Z.; SASTRY, B. R. Impairment of long-term potentiation in rats fed with vitamin E-deficient diet. **Brain research**, v. 681, n. 1-2, p. 193–6, 29 maio 1995.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. C. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 24, n. 12, p. 1277–81, jan. 1991.

YILMAZ, T. et al. Efficacy of dexamethasone on penicillin-induced epileptiform activity in rats: an electrophysiological study. **Brain research**, v. 1554, p. 67–72, 20 mar. 2014.

ZHANG, X. et al. Noradrenergic activity regulated dexamethasone-induced increase of 5-HT₃ receptor-mediated glutamate release in the rat's prelimbic cortex. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 12, p. 2157–67, dez. 2012.

ZULOAGA, D. G. et al. Dexamethasone induces apoptosis in the developing rat amygdala in an age-, region-, and sex-specific manner. **Neuroscience**, v. 199, p. 535–47, 29 dez. 2011.

6. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA *BRAIN RESEARCH*

Title: Neonatal administration of dexamethasone accelerates spreading depression in the developed rat cortex, and the antioxidant vitamins C and E counteract this effect

Authors: Andréia Albuquerque Cunha **Lopes-de-Morais**, Rosângela Figueiredo **Mendes-da-Silva**, Eryka **Maria-dos-Santos**, Rubem Carlos Araújo **Guedes***

Affiliation: Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

***Corresponding author:** Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Phone: +55-81-21268936

Fax: +55-81-21268473

e-mail: guedes.rca@gmail.com

Second e-mail: rguedes@ufpe.br

Highlights

Title:

Neonatal administration of dexamethasone accelerates spreading depression in the developed rat cortex, and the antioxidant vitamins C and E counteract this effect

Authors: Andréia Albuquerque Cunha **Lopes-de-Morais**, Rosângela Figueiredo **Mendes-da-Silva**, Eryka **Maria-dos-Santos** and Rubem Carlos Araújo **Guedes.**

Highlights:

We treated developing rats with dexamethasone (Dex) and/or vitamins C and E.

We studied spreading depression (CSD) parameters and CSD-induced ECoG potentiation.

Dex accelerated CSD, but did not change ECoG potentiation.

The vitamins C and E counteracted the Dex effect.

Neonatal Dex therapy may benefit from vitamins C and E coadministration.

Abstract

The use of dexamethasone (Dex) to treat preterm infants suffering from chronic lung disease may produce adverse effects in the developing brain. Here, we evaluated the effects of neonatal Dex on the propagation of cortical spreading depression (CSD), and tested the action of the vitamins C and E against the Dex effect. Five groups of Wistar rats received respectively [1] no treatment (Naïve); [2] Vehicle (V); [3] tapering doses of Dex (Dex; 0.5 mg/kg, 0.3 mg/kg and 0.1 mg/kg) on PND1–3; [4] Dex plus 200 mg/kg vitamin C and 100mg/kg vitamin E (DexCE); [5] only vitamins C and E (CE). Vehicles and vitamins were administered on PND1-6. CSD was recorded when the pups became developed (PND 60-70). The Dex-treated group presented with higher CSD-velocities (mean values $\pm$ SD, in mm/min: 4.14 ± 0.22 ; n=10) compared with the control groups (Naïve: 3.52 ± 0.13 ; n=8; V: 3.57 ± 0.18 ; n=10; CE: 3.51 ± 0.24 ; n=10; $p<0.05$). This effect was antagonized by the vitamins C and E (DexCE group; CSD velocity: 3.43 ± 0.12 ; n=9). No intergroup difference was observed concerning P amplitude and duration. In all groups, after the cortex underwent CSD, the ECoG amplitude increased about 50% compared with the baseline amplitude for the same animal (CSD-induced ECoG potentiation), but no intergroup difference was found. Data suggest that coadministration of antioxidant vitamins with Dex may be a helpful therapeutic strategy to reduce brain adverse effects of dexamethasone.

Keywords: dexamethasone; antioxidant vitamins; brain development; spreading depression; glucocorticoids; epilepsy.

1. Introduction

Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid hormone that is largely applied to preterm infants for preventing or treating chronic lung diseases (Choi et al., 2004; Doyle et al., 2014a, 2014b). However, neonatal treatment with glucocorticoids can produce unwanted side effects in the developing nervous system of children (Hitzert et al., 2014; Shinwell et al., 2000; Stark et al., 2001). Evidence from laboratory animals also indicates such adverse effects (Bhatt et al., 2013; Duksal et al., 2009; Ichinohashi et al., 2013; Kim et al., 2013; Menshanov et al., 2014; Neal et al., 2003; Sze et al., 2013; Zuloaga et al., 2011). These reports address the brain effects of dexamethasone on behavioral, biochemical and morphological parameters. Some other studies, however, demonstrate the existence of electrophysiological changes in animals previously treated with dexamethasone, including the appearance (Davidson et al., 2011) or modulation of epileptiform activity (Yılmaz et al., 2014). The electrophysiological alterations also include modulation of synaptic plasticity-dependent phenomena, such as long-term potentiation (LTP) (Kamphuis et al., 2003; Lin et al., 2006; Wang et al., 2010). In this scenario, the experimental investigation based on electrophysiological phenomena related to epilepsy and LTP is highly desirable. This is the case of the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) that has been largely used by our group (Batista-de-Oliveira et al., 2012a; Torrente et al., 2014b; see Guedes, 2011 for a review), as well as by others (Footitt and Newberry, 1998; Dreier, 2011).

The CSD has been experimentally described as a reversible and propagated wave of reduction of the spontaneous electrical activity of the cerebral cortex (Leão, 1944). This phenomenon occurs in response to electrical, chemical or mechanical stimulation applied on one point of the cortical surface. Simultaneously with the depression of the brain activity, a slow direct current (DC) potential change of the tissue has been described (Leão, 1947). CSD has been widely used to evaluate brain processes dependent upon neural excitability (Batista-

de-Oliveira et al., 2012b; Guedes et al, 2005; Lima et al., 2013), and a causal association between CSD and a LTP-like potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity has been previously demonstrated both *in vitro* (Footitt and Newberry, 1998) and *in vivo* (Faraguna et al., 2010; Guedes et al., 2005; Souza et al., 2011).

Dexamethasone increases the presence of reactive oxygen species (ROS) in cultured hippocampus and cerebral cortex (McIntosh and Sapolsky, 1996), and reduces the basal activity of brain antioxidant enzymes (McIntosh et al., 1998). Considering the hypothesis that most of the adverse effects of dexamethasone are due to oxidative stress, studies have employed the antioxidant vitamins C and E to counteract the adverse effects of this synthetic hormone (Camm et al., 2011; Herrera et al., 2010; Niu et al., 2013; Williams et al., 2012). For instance, these vitamins are able to minimize neuronal loss, as well as oxidative stress in the brain produced by the dexamethasone treatment (Camm et al., 2011). However, concerning the analysis of dexamethasone-induced electrophysiological alterations, no information is currently available about the effects of the combination of dexamethasone with antioxidant vitamins on the brain electrical activity. In this context, it is interesting mentioning that the use of CSD has been also employed for studying the actions of antioxidants on the brain (Abadie-Guedes et al., 2008; Guedes et al., 2012; Monte-Guedes et al., 2011).

The current *in vivo* study evaluated, in the albino rat, the long lasting effects of neonatal dexamethasone, combined or not with the administration of antioxidant vitamins C and E, on changes in CSD features and LTP-like electrocorticogram (ECoG)-potentiation associated to CSD.

2. RESULTS

2.1. Body weight

There was no difference in the body weight between the five experimental groups on PND (Postnatal day) 1 and PND2. From PND3 to PND6 the Dex and DexCE groups (rats previously treated i.p. with dexamethasone and dexamethasone plus vitamins C and E, respectively) showed lower body weight than the Naïve (without treatment), V (injected with vehicles solutions) and CE (treated with the antioxidant vitamins C and E) groups. However, no weight difference was observed when the pups reached PND60 (**Table 1**).

Table 1: Body weights in the five experimental group of rats, injected (i.p.) with dexamethasone (Dex group), or antioxidant vitamins (CE group), or both treatment (DexCE group). Two additional control groups were injected only with the vehicles in which these drugs were dissolved (V group) or received no treatment (Naïve group).

	Body weight (g)						
	PND1	PND2	PND3	PND4	PND5	PND6	PND60
Naïve	6.70	7.69	9.17	10.94	12.70	14.94	255.00
	± 0.82	± 0.70	± 0.90	± 1.38	± 1.87	± 1.13	± 22.69
V	6.91	7.85	9.50	11.20	12.50	14.28	240.30
	± 0.89	± 0.82	± 0.94	± 1.32	± 1.65	± 1.73	± 30.20
Dex	6.80	6.89	7.10	8.10	8.90	10.25	246.94
	± 0.54	± 0.49	± 0.70*	± 0.84*	± 1.24*	± 1.60*	± 12.05
DexCE	6.95	7.20	7.80	9.20	10.35	11.75	244.44
	± 0.76	± 0.79	± 1.06*	± 1.16*	± 1.13*	± 1.06*	± 24.96
CE	6.90	8.00	9.20	11.00	12.35	14.05	251.21
	± 0.94	± 1.04	± 1.23	± 1.30	± 1.83	± 1.85	± 16.77

PND: postnatal day

Data are reported as mean±S.D.; * significantly different from the Naïve, V and CE groups in the same age ($P < 0.05$; one way ANOVA plus Holm-Sidak test).

2.2. CSD parameters

The 1-min application of a cotton ball (1-2 mm diameter) soaked with 2% KCl (approximately 270 mM) to a point of the occipital cortical surface was very effective in eliciting a single CSD episode that was propagated and sequentially recorded at two points on the parietal cortex. This is illustrated in the recordings shown in **Figure 1**.

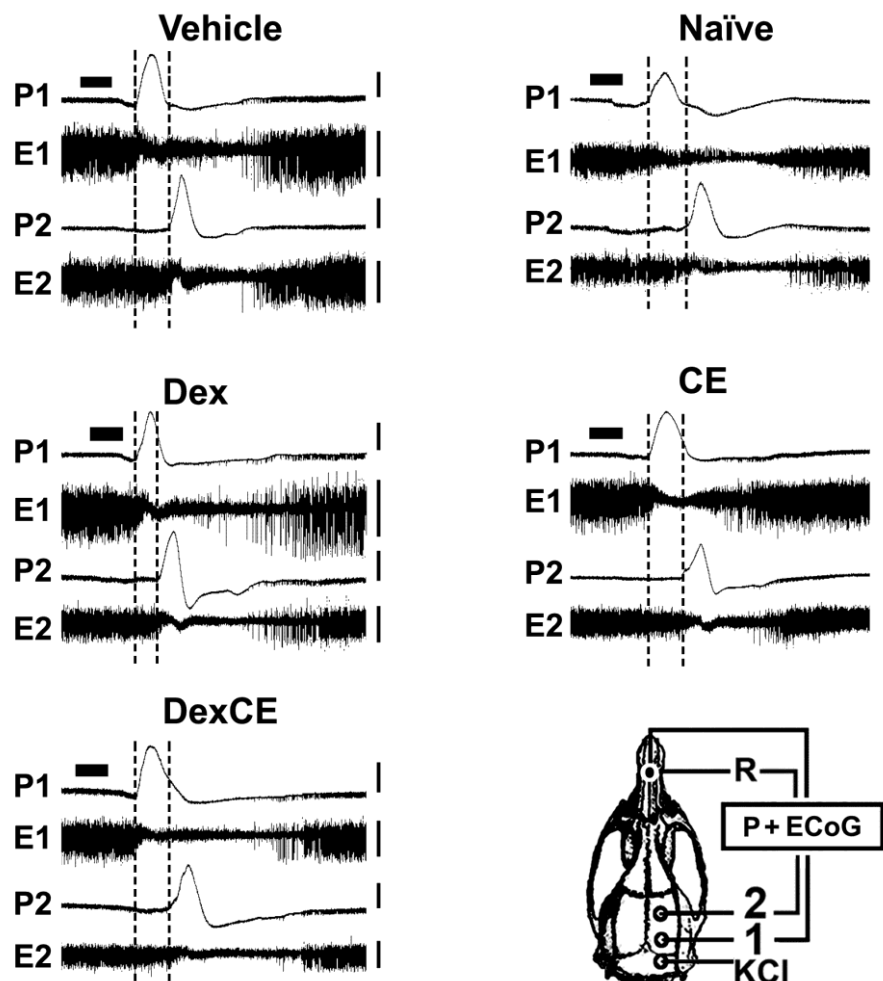


Figure 1: Electrocorticogram (ECoG) and slow potential change (P) recordings during CSD in five rats representative of the experimental groups: Naïve, Vehicle, Dexamethasone (Dex), Dexamethasone plus vitamins C and E (DexCE) and only vitamins C and E (CE). The horizontal bars, which correspond to 1 min, show the time of KCl application to elicit CSD at one occipital cortical point in the right hemisphere. CSD propagation in the occipital-to-frontal direction was monitored for 4h at the 2 recording points in the parietal region of the same hemisphere. The right-bottom skull diagram shows the recording positions 1 and 2 and the position of the reference electrode (R), on the nasal bones, as well as the place of KCl stimulus. The vertical calibration bars indicate 5 mV for the P recordings and 500 μ V for the ECoG recordings (negative upwards).

Measurements of the amplitude and duration of the CSD negative potential change revealed no intergroup difference, with the mean amplitudes ranging from 7.50 ± 1.45 mV to 8.22 ± 2.24 mV, and the mean durations ranging from 72.18 ± 3.98 s to 75.14 ± 6.77 s (**Table 2**).

Dex group showed higher CSD propagation velocity (4.14 mm/min $\pm$ 0.22 ; $n = 10$) than the three control groups (Naïve: 3.52 mm/min $\pm$ 0.13 ; $n=8$; V: 3.57 mm/min $\pm$ 0.18 ; $n=10$; CE: 3.51 ± 0.24 mm/min; $n=10$) ($p < 0.05$). The treatment with Dex plus vitamins C and E (group DexCE) resulted in CSD velocity (3.43 mm/min $\pm$ 0.12 ; $n = 9$) comparable to the controls. **Figure 2** illustrates these findings.

Table 2: Amplitude and duration of the slow potential change (P) during the CSD in young adults rats (PND 60-70) distributed in five experimental groups according to the previous (PND 1-6) hormonal and antioxidant treatments: 1) Naïve Control; 2) Vehicle Control (V); 3) dexamethasone (Dex); 4) dexamethasone with vitamins C and E (DexCE) and 5) control with vitamins C and E (CE). Data are presented as mean $\pm$ SEM of 9 CSD episodes elicited at 30-min intervals by 1-min 2% KCl application during the 4-h recording period. There was no difference between the experimental groups (one way ANOVA).

	CSD features	
	P amplitude	P duration
	(mV)	(s)
Naïve	7.50 ± 1.45	74.80 ± 8.56
V	8.22 ± 2.24	72.18 ± 3.98
Dex	7.75 ± 2.80	75.14 ± 6.77
DexCE	7.84 ± 2.24	74.67 ± 7.65
CE	7.78 ± 2.36	73.09 ± 6.33

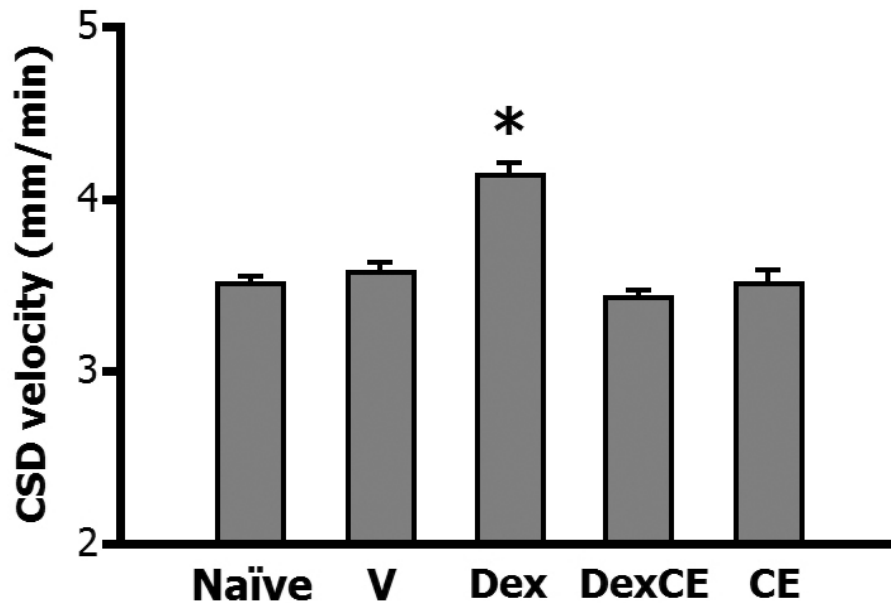


Figure. 2: Propagation velocities of CSD in 60- to 70-day-old rats that received previously no treatment (naïve group, $n = 8$), vehicle (V, $n = 10$), dexamethasone (Dex, $n = 10$), dexamethasone with vitamins C and E (DexCE, $n = 9$) or only vitamins C and E (CE, $n = 10$). Data are presented as mean $\pm$ SEM of 9 CSD episodes elicited during the 4-h recording period, at 30-min intervals, by 1-min application of a cotton ball (1-2 mm diameter) soaked in 2% KCl. * $P < 0.05$ compared to the other groups (ANOVA plus Holm-Sidak test).

2.3. ECoG potentiation associated to CSD

In all groups, the amplitudes of the digitalized ECoG (one 10-min sample from each hour) in the baseline period were compared with those of the samples from the CSD period. The ECoG amplitude became higher in the CSD period compared with the baseline period, as can be observed in **Figure 3**. The quantification of the ECoG amplitudes revealed a CSD-related increase of about 50-60% ($p < 0.05$; paired t-test). Data are presented in **Table 3**. Although the Dex group presented with a nonsignificant trend to display less amplitude increases, no intergroup difference was observed (**Table 3**).

Table 3: Increase of the ECoG amplitude after CSD in developed rats (PND 60-70). ECoG was recorded for 2 baseline hours (before CSD started being regularly elicited) followed by 4 h in which CSD was elicited at 30 min intervals. In each recording hour one 10-min recording sample was analyzed with an algorithm implemented in MATLAB™. Data (mean $\pm$ SD) are presented as relative units (values of the normalized amplitudes in relation to the lowest value, which was considered equal to 1). Compared with the baseline period, the amplitudes after CSD were significantly higher ($P < 0.05$; paired t tests) in all groups, as indicated by the asterisks. There was no difference between the experimental groups (one way ANOVA).

	EcoG amplitude (Relative units)	
	Before CSD	After CSD
Naïve	1.05 $\pm$ 0.03	1.71 $\pm$ 0.20*
V	1.06 $\pm$ 0.04	1.72 $\pm$ 0.33*
Dex	1.06 $\pm$ 0.05	1.50 $\pm$ 0.23*
DexCE	1.05 $\pm$ 0.03	1.68 $\pm$ 0.37*
CE	1.04 $\pm$ 0.02	1.70 $\pm$ 0.42*

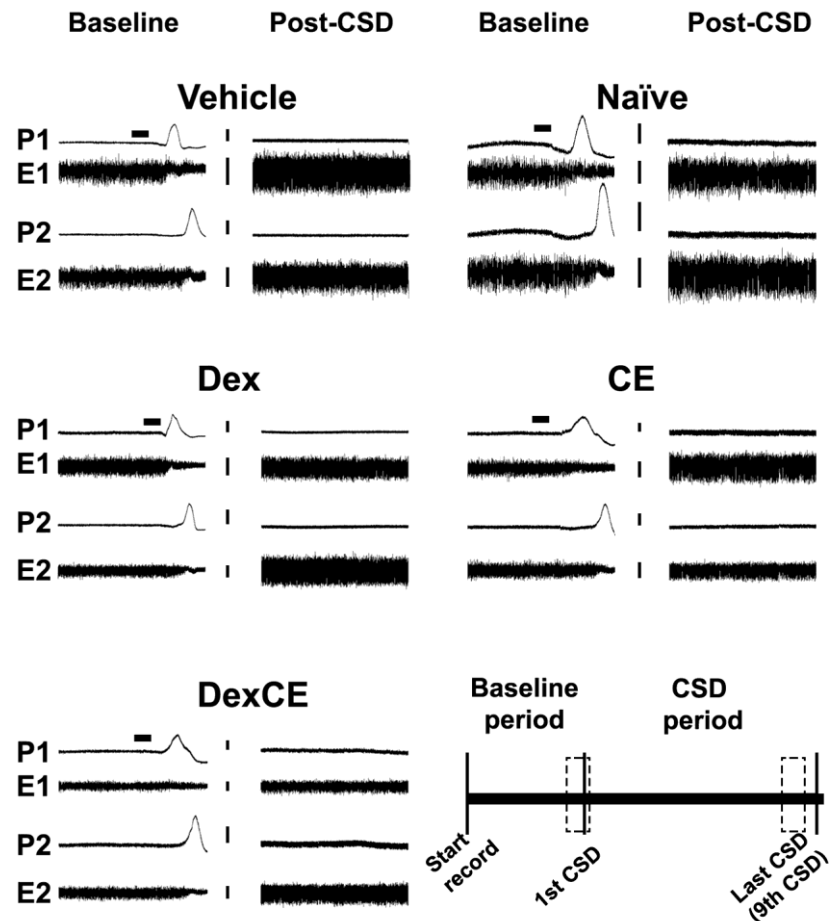


Figure 3: Examples of recordings of spontaneous cortical activity (Electrocorticogram [E] and DC potential recordings [P]) on the right hemisphere of five animals representative of the five groups of this study, showing the potentiation of the electrocorticographic activity after CSD. Vehicle, naïve, Dex, CE and DexCE refers to rats treated respectively with the vehicle used to dilute dexamethasone and vitamin C (saline solution), and vitamin E (olive oil), no treatment, treated with dexamethasone, treated with vitamins C and E, and treated with dexamethasone plus vitamins C and E. For each animal, comparison between the baseline recordings (left traces) and the post-CSD recordings (right traces, taken after a series of 7 episodes of cortical spreading depression [CSD]) revealed the potentiation of the ECoG amplitude. The horizontal bars in P1-traces indicate the period (1 min) in which stimulation with 2% KCl was applied to the occipital region of the same hemisphere to elicit CSD, which was recorded at two parietal points 1 and 2 (see skull diagram in Figure 1). Vertical bars correspond to -5 mV in P and -0.5 mV in E (negative upwards). The bottom-right time diagram of the recording session indicates the time-points (rectangles formed by interrupted lines) from which the baseline and post-CSD recording samples were taken (respectively left and right rectangles). The beginning of the record, as well as the first and the last (9th) CSD episode are indicated in the diagram by the vertical solid lines.

3. DISCUSSION

In this study we demonstrated, for the first time, that the treatment early in life (on the postnatal days 1 to 6) with the glucocorticoid dexamethasone clearly accelerates CSD propagation, and the coadministration of antioxidant vitamins with Dex counteracted that effect. As the CSD acceleration was measured when the animals were quite developed (60-70 days of life), we suggest that the Dex action on CSD propagation is permanent, or at least long-lasting, as suggested for other brain effects of Dex (Ichinohashi et al., 2013; Li et al., 2013; Vázquez et al., 2012). The mammalian brain development largely occurs early in life, during the perinatal period. In the rat, the lactation period is very sensitive to adverse environmental and nutritional conditions (Morgane et al., 1978; Smart and Dobbing, 1971). It has been demonstrated that Dex exposure early in life can change the brain morphology and function in rodents, producing long-term effects (Ichinohashi et al., 2013; Li et al., 2014; Vázquez et al., 2012).

Clinical and experimental studies show that early-life DEX exposure exerts a lasting adverse effect on somatic growth (Flagel et al., 2002; Shrivastava et al., 2000). In line with those results, our DEX-treated rats weighted significantly less than those of the control groups. This adverse effect may be causally linked, at least in part, to inadequate nutritional intake during the postnatal period, or to the rise in tissue catabolism, or protein breakdown after Dex treatment (Leitch et al., 1999; Neal et al., 2004). We consider interesting to mention that in the rat, Dex exposure during the late gestational period enhances the serum levels of the anorexic factor leptin, and lowers the hypothalamic mRNA levels of the orexigenic factor NPY in the progeny (Iwasa et al., 2014). Wang and colleagues (Wang et al., 2010) did not find any difference in the maternal care between Dex and vehicle-treated rats; these authors, therefore, argue that the somatic growth deficits observed in DEX-treated rat pups could hardly be explained by differences in the maternal care, as compared with control pups. This

view is also supported by the present data.

CSD has been implicated in important neurological human disorders, such as epilepsy, migraine and traumatic brain injury (Dreier et al., 2012; Noseda and Burstein, 2013; Torrente et al., 2014a). Abnormal EEG activity, including seizures, is commonly seen in the preterm newborn within 48 h of premature birth, and is associated with adverse outcome (Hellström-Westas and Rosén, 2005; Logitharajah et al., 2009; Shah et al., 2012). In adult rats, Dex can modulate the *status epilepticus* resulting in better or worse outcome depending upon the experimental paradigm (Al-Shorbagy et al., 2012; Duffy et al., 2014; Yılmaz et al., 2014). However, this issue had not been addressed yet in developing rats. Thus, it is critical to understand whether and how common clinical interventions such as neonatal glucocorticoid therapy affect brain electrical activity as the brain develops. Several studies have suggested alternative therapeutic approaches aiming to minimize the adverse brain effects of dexamethasone treatment early in life. These include handling (Claessens et al., 2012b), pharmacological manipulation of the serotonergic system (Nagano et al., 2012), use of statins (Tijsseling et al., 2013) and favorable lactation conditions (Wang et al., 2010). In this context, antioxidant vitamins have been successfully employed to attenuate Dex-related physiological disturbances in the cardiovascular system (Herrera et al., 2010; Niu et al., 2013), as well as in the nervous system (Camm et al., 2011). The present data represent an experimental contribution to that, mainly considering that the antioxidant vitamins C and E reversed the CSD Dex effects.

Our findings using CSD can be explained by different mechanisms. We suggest that the following four factors are most likely involved, and deserve comment: oxidative stress, glutamatergic system, glial activity and myelin content. The most plausible hypothesis involves oxidative stress because evidence suggests that glucocorticoid treatment increases the production of reactive oxygen species (ROS) in cultured hippocampus and cerebral cortex

(McIntosh and Sapolsky, 1996) and decreases the activity of cerebral antioxidant enzymes (McIntosh et al., 1998). Pandya et al. (2007) emphasize that repeated exposure to Dex can significantly influence the oxidative energy metabolism of brain mitochondria in young growing animals as well as in adults. Camm et al. (2011) showed that neonatal Dex treatment increases oxidative stress indexes in the cerebral cortex, and the coadministration of Dex and antioxidant vitamins C and E minimize it, in addition to reducing the loss of neuronal mass induced by Dex treatment. Several reports have related CSD with oxidation processes and/or antioxidants factors in the brain (Guedes et al., 2012) and it has been observed that oxidative stress increases CSD propagation velocity, while antioxidants decrease the velocity (Abadie-Guedes et al., 2008), which is in accordance with our results.

The glutamatergic system has an important role in brain development, functioning and plasticity of the central nervous system (McDonald and Johnston, 1990). Recently, it was reported that neonatal Dex exposure produces behavioral abnormalities in juvenile and adult mice by altering glutamatergic neurotransmission via the NMDA receptor, and NMDA receptor antagonist is able to counteract these Dex -induced abnormalities in later life (Li et al., 2014). Therefore, we also consider reasonable to postulate that Dex-induced disturbances in glutamatergic neurotransmission may result in CSD effects. Interestingly, endogenous release of excitatory amino acids and their action on the NMDA receptor play an important role in the initiation, propagation and duration of CSD (Marranes et al., 1988; Zhou et al., 2013). Our group has previously demonstrated a long-lasting facilitation of CSD in rats treated early-in-life with monosodium glutamate (Lima et al., 2013). Thus, it is tempting to suggest that Dex treatment at early developmental stages may hyperactivate NMDA receptors contributing to the here reported CSD acceleration.

Considering that CSD propagation depends largely on the finely balanced electrochemical equilibrium of the neuron–glial interactions, as well as the extracellular

milieu (Martins-Ferreira et al., 2000), changes in the number and activity of glial cells could be related with the increased CSD propagation velocity in the present Dex group. Claessens et al. (2012a) reported that neonatal Dex treatment causes a significant reduction in the astrocyte number and density in the hippocampus and corpus callosum. Unemura et al. (2012) also observed in *in vitro* and *in vivo* conditions that the astrocyte number decreases after applying glucocorticoids, and they suggest that this decrease occurs by reducing glucocorticoid receptor expression.

The propagation velocity of CSD inversely correlates with cortical myelin content in rodents: toxic and autoimmune-induced cortical demyelination accelerate CSD, while genetically engineered hypermyelination (neuregulin-1 type I transgenic mice) decelerates CSD (Merkler et al., 2009). Therefore, it is reasonable to associate the higher CSD propagation velocity in the Dex-treated group with reduction of the cortical myelin content. In line with this association, Kim et al. (2013) observed a decrease in the myelin content and changes on the oligodendrocyte morphology after administering 0.5 mg/kg/d Dex on the three first post natal days. Hypomyelination was not observed, however, when a lower dose of Dex was used (Camm et al., 2011). Further studies are necessary to clarify the real role of each of these hypotheses.

Notably, changes in brain excitability also influence CSD propagation, lending support to the idea that CSD is a useful index of brain excitability (Souza et al., 2011). Because CSD is an excitability-related brain phenomenon, we evaluated the LTP-like ECoG-potential produced in the cortical tissue by the CSD propagation (Footitt and Newberry, 1998; Souza et al., 2011). Potentiation significantly occurred in all groups, and no intergroup difference was observed, although the Dex group presented with a nonsignificant trend to display less ECoG-potential. Interestingly, *in vitro* studies have provided evidence that Dex treatment early-in-life impairs the LTP in hippocampus, as well as memory processes

(Kamphuis et al., 2003; Lin et al., 2006; Wang et al., 2010).

In conclusion, the present *in vivo* study in young rats describes novel and enduring electrophysiological CSD effects that are attributed to the previous treatment with Dex and/or the antioxidant vitamins C and E. The results allow us to draw two conclusions. First, Dex treatment increases CSD propagation velocity in a long-lasting manner. Second, this effect is abolished by the concomitant treatment with the antioxidant vitamins C and E. We suggest that Dex therapy in premature organisms may benefit from the coadministration of antioxidant vitamins, concerning the brain adverse effects of glucocorticoids, although the appropriate extrapolation from the rat brain to the human brain still requires further investigation.

4. Experimental Procedure

4.1. Animals

Forty-seven Wistar male newborn rats from litters with 8 - 9 pups were used in this study. The animals were handled in accordance with the standards of the Ethics Committee for Animal Research of our university, which comply with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH; Bethesda, USA).

Shortly after birth (PND=0), the pups were assigned to five experimental groups according to the hormonal and antioxidant treatments: 1) Naive Control (N; without any treatment); 2) Vehicle Control (V; injected only with the vehicle solutions); 3) dexamethasone (Dex); 4) dexamethasone with vitamins C and E (DexCE) and 5) control with vitamins C and E (CE). During the treatment period (PND 1 to 6), each rat received two intraperitoneal injections daily ($10 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ for each) due to the different solubilities of dexamethasone (Dexamethasone-21-phosphate, disodium salt) and vitamin C [L-ascorbic

acid] (both dissolved in 0.9% NaCl) and vitamin E [(+)- α -tocopherol] (dissolved in olive oil). The three drugs were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Dexamethasone was administered on the three first postnatal days in tapering doses: 0.5 mg/kg (PND=1), 0.3 mg/kg (PND=2) and 0.1 mg/Kg (PND=3). The antioxidant vitamins C (200 mg/kg/day) and E (100 mg/kg/day) were applied daily from the first to the sixth day of life at fixed doses, as previously described (Herrera et al., 2010; Camm et al., 2011; Williams et al., 2012; Niu et al., 2013). The vitamin solutions were prepared daily, shortly before the injections. **Table 4** presents the experimental groups of this study.

After weaning (PND 21), the pups were housed in polypropylene cages (51.0 cm x 35.5 cm x 18.5 cm; 3-4 rats per cage) with free access to water and commercial standard diet (PRESENCE, Purina, Brazil). The animals' room was under a 12h/12h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.), and room temperature at 23 ± 1 ° C. Body weight was recorded daily during the hormonal and antioxidant treatment (PND 1-6) and on the PND 60.

Table 4: Description of the treatments (intraperitoneal injections) given to the five experimental groups from postnatal day (PND) 1 to 6. Animals received no injections (group naïve), or the vehicles (group V; saline in the first injection and olive oil in the second injection), or dexamethasone in the first injection plus vehicle in the second injection (group Dex), or Dex+Vitamin C (first injection) plus Vitamin E (second injection), or just the vitamins C and E (in the first and second injections, respectively). Dexamethasone was administered from PND 1 to 3. From PND 4 to 6, dexamethasone was discontinued.

	i.p. injections			
	(PND1-PND3)		(PND4-PND6)	
	1st injection	2nd injection	1st injection	2nd injection
Naïve	-	-	-	-
V	0.9% NaCl	olive oil	0.9% NaCl	olive oil
Dex	Dex	olive oil	0.9% NaCl	olive oil
DexCE	Dex + vitamin C	Vitamin E	Vitamin C	Vitamin E
CE	Vitamin C	Vitamin E	Vitamin C	Vitamin E

4.2. CSD recording

When the pups reached 60-70 days of age, they were anesthetized i.p. with a mixture of 1000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, and three trephine holes were drilled on the right side of the skull. These holes were aligned in the frontal-occipital direction and paralleled to the midline. The recording session lasted 6 h; in the initial 2 h (baseline period), no CSD was elicited; in the last 4 h (CSD period), CSD was elicited at 30-min intervals by application of a cotton ball (1-2 mm diameter) soaked with 2% KCl solution (approximately 270 mM) placed for 1-min at the posterior hole drilled on the occipital region. The two other

holes on the parietal region served as recording sites. The DC slow potential change typical of CSD, and the ECoG (band pass filters: 1-35 Hz) were simultaneously recorded using two Ag–AgCl Agar-Ringer electrodes (one in each hole on the parietal region) against a common reference electrode of the same type placed on the nasal bones. The spontaneous cortical electrical activity was amplified and digitalized with a MP100 or MP150 system (BIOPAC Systems, Inc, USA), and stored in an IBM-compatible computer for further analysis. The amplitude and duration of the typical CSD negative DC potential change, as well as the CSD propagation velocity, were calculated. In each recording hour, one 10-min recording sample of the digitalized ECoG was selected and the average ECoG amplitude was calculated with an algorithm implemented in MATLAB™ (The MathWorks, Inc.). For each animal, ECoG amplitude data are presented as relative units (values of the normalized amplitudes in relation to the lowest sample value, which was considered equal to 1).

During all the recording period, rectal temperature was maintained at $37\pm1^{\circ}\text{C}$ by means of a heating blanket and the electrodes positions, as well as the gains of the amplifiers, remained unchanged.

4.3. Statistical analysis

For intergroup comparisons (body weight, amplitude, duration, velocity and ECoG potentiation) data were analyzed by one-way ANOVA followed by Holm-Sidak test. For intragroup comparisons of the ECoG analysis (baseline *versus* CSD period) the paired t test was used. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE- IBPG-0141-2.07/12), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no. 4191), and Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT nº 573604/2008-8). R.C.A. Guedes is a Research Fellow from CNPq (nº 301190/2010-0).

REFERENCES

- Abadie-Guedes, R., Santos, S.D., Cahú, T.B., Guedes, R.C.A., de Souza Bezerra, R., 2008. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1417–21.
- Al-Shorbagy, M.Y., El Sayeh, B.M., Abdallah, D.M., 2012. Diverse effects of variant doses of dexamethasone in lithium-pilocarpine induced seizures in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 13–21.
- Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A.C., Mendes-da-Silva, R.F., Guedes, R.C.A., 2012a. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. *Exp. Gerontol.* 47, 452–57.
- Batista-de-Oliveira, M., Monte-Silva-Machado, K.K., Paiva, a K., Lima, H., Fregni, F., Guedes, R.C. A, 2012b. Favorable and unfavorable lactation modulates the effects of electrical stimulation on brain excitability: a spreading depression study in adult rats. *Life Sci.* 91, 306–11.
- Bhatt, A.J., Feng, Y., Wang, J., Famuyide, M., Hersey, K., 2013. Dexamethasone induces apoptosis of progenitor cells in the subventricular zone and dentate gyrus of developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* 91, 1191–202.
- Camm, E.J., Tijsseling, D., Richter, H.G., Adler, A., Hansell, J. A, Derks, J.B., Cross, C.M., Giussani, D. A, 2011. Oxidative stress in the developing brain: effects of postnatal glucocorticoid therapy and antioxidants in the rat. *PLoS One* 6, e21142.
- Choi, C.W., Hwang, J.H., Shim, J.W., Ko, S.Y., Lee, E.K., Kim, S.S., Chang, Y.S., Park, W.S., Shin, S.M., 2004. Decreasing incidence of chronic lung disease despite the gradual reduction of postnatal dexamethasone use in very low birth weight infants. *J. Korean Med. Sci.* 19, 514–8.
- Claessens, S.E.F., Belanoff, J.K., Kanatsou, S., Lucassen, P.J., Champagne, D.L., de Kloet, E.R., 2012a. Acute effects of neonatal dexamethasone treatment on proliferation and astrocyte immunoreactivity in hippocampus and corpus callosum: towards a rescue strategy. *Brain Res.* 1482, 1–12.
- Claessens, S.E.F., Daskalakis, N.P., Oitzl, M.S., de Kloet, E.R., 2012b. Early handling modulates outcome of neonatal dexamethasone exposure. *Horm. Behav.* 62, 433–41.
- Davidson, J.O., Quaedackers, J.S.L.T., George, S. A, Gunn, A.J., Bennet, L., 2011. Maternal dexamethasone and EEG hyperactivity in preterm fetal sheep. *J. Physiol.* 589, 3823–35.
- Doyle, L.W., Ehrenkranz, R.A., Halliday, H.L., 2014a. Late (> 7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane database Syst. Rev.* 5, CD001145.
- Doyle, L.W., Ehrenkranz, R.A., Halliday, H.L., 2014b. Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane database Syst. Rev.* 5, CD001146.
- Dreier, J.P., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439–47.
- Dreier, J.P., Major, S., Pannek, H.W., Woitzik, J., Scheel, M., Wiesenthal, D., Martus, P., Winkler, M.K., Hartings, J.A., Fabricius, M., Speckmann, E.J., Gorji, A., 2012.

- Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain*. 35(Pt 1),259-275.
- Duffy, B.A., Chun, K.P., Ma, D., Lythgoe, M.F., Scott, R.C., 2014. Dexamethasone exacerbates cerebral edema and brain injury following lithium-pilocarpine induced status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 63, 229–236.
- Duksal, F., Kilic, I., Tufan, A C., Akdogan, I., 2009. Effects of different corticosteroids on the brain weight and hippocampal neuronal loss in rats. *Brain Res.* 1250, 75–80.
- Faraguna, U., Nelson, A., Vyazovskiy, V. V., Cirelli, C., Tononi, G., 2010. Unilateral cortical spreading depression affects sleep need and induces molecular and electrophysiological signs of synaptic potentiation in vivo. *Cereb. cortex* 20, 2939–47.
- Flagel, S.B., Vázquez, D.M., Watson, S.J., Neal, C.R., 2002. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. *Am. J. Physiol.* 282, R55–63.
- Footitt, D.R., Newberry, N.R., 1998. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain Res.* 781, 339–42.
- Guedes, R.C.A., Tsurudome, K., Matsumoto, N., 2005. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. *Brain Res.* 1036, 109–14.
- Guedes, R.C.A., 2011. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition, in: Preedy, V.R., Watson, R.R., Martin, C.R. (Eds.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Springer, New York, NY, pp. 2343–2354.
- Guedes, R.C. A., Abadie-Guedes, R., Bezerra, R.D.S., 2012. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. *Nutr. Neurosci.* 15, 111–9.
- Hellström-Westas, L., Rosén, I., 2005. Electroencephalography and brain damage in preterm infants. *Early Hum. Dev.* 81, 255–61.
- Herrera, E. a, Verkerk, M.M., Derks, J.B., Giussani, D. a, 2010. Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. *PLoS One* 5, e9250.
- Hitzert, M.M., Van Braeckel, K.N.J. A, de Bok, M., Maathuis, C.G.B., Roze, E., Bos, A.F., 2014. Functional outcome at school age of preterm-born children treated with high-dose dexamethasone. *Early Hum. Dev.* 1–6.
- Ichinohashi, Y., Sato, Y., Saito, A., Ito, M., Watanabe, K., Hayakawa, M., Nakanishi, K., Wakatsuki, A., Oohira, A., 2013. Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses. *Early Hum. Dev.* 89, 283–8.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Munkhzaya, M., Tungalagsuvd, A., Kawami, T., Murakami, M., Yamasaki, M., Kato, T., Kuwahara, A., Yasui, T., Irahara, M., 2014. Prenatal exposure to glucocorticoids affects body weight, serum leptin levels, and hypothalamic neuropeptide-Y expression in pre-pubertal female rat offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 36C, 1–4.
- Kamphuis, P.J.G.H., Gardoni, F., Kamal, A., Croiset, G., Bakker, J.M., Cattabeni, F., Gispen, W.H., van Bel, F., Di Luca, M., Wiegant, V.M., 2003. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: involvement of the NMDA receptor complex. *FASEB J.* 17.

- Kim, J.W., Kim, Y.J., Chang, Y.P., 2013. Administration of dexamethasone to neonatal rats induces hypomyelination and changes in the morphology of oligodendrocyte precursors. *Comp. Med.* 63, 48–54.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359–390.
- Leão, A.A.P., 1947. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 10, 409–14.
- Leitch, C.A., Ahlrichs, J., Karn, C., Denne, S.C., 1999. Energy expenditure and energy intake during dexamethasone therapy for chronic lung disease. *Pediatr. Res.* 46, 109–13.
- Li, S., Fujita, Y., Zhang, J., Ren, Q., Ishima, T., Wu, J., Hashimoto, K., 2014. Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiol. Dis.* 62C, 124–134.
- Lima, C.B., Soares, G.D.S.F., Vitor, S.M., Castellano, B., Andrade da Costa, B.L.D.S., Guedes, R.C.A., 2013. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. *Life Sci.* 93, 388–92.
- Lin, H., Huang, C., Hsu, K., 2006. Effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. *Ann. Neurol.* 59, 939–51. doi:10.1002/ana.20885
- Logitharajah, P., Rutherford, M. A., Cowan, F.M., 2009. Hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants: antecedent factors, brain imaging, and outcome. *Pediatr. Res.* 66, 222–9.
- Marrannes, R., Willems, R., De Prins, E., Wauquier, A., 1988. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res.* 457, 226–40.
- Martins-Ferreira, H., Nedergaard, M., Nicholson, C., 2000. Perspectives on spreading depression. *Brain Res. Rev.* 32, 215–34.
- McDonald J.W., Johnston M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res.* 15, 41–70.
- McIntosh, L.J., Hong, K.E., Sapolsky, R.M., 1998. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res.* 791, 209–14.
- McIntosh, L.J., Sapolsky, R.M., 1996. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp. Neurol.* 141, 201–6.
- Menshanov, P.N., Bannova, A. V, Dygalo, N.N., 2014. Dexamethasone suppresses the locomotor response of neonatal rats to novel environment. *Behav. Brain Res.* 271C, 43–50.
- Merkler, D., Klinker, F., Jürgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B.G., Sereda, M.W., Stadelmann-Nessler, C., Guedes, R.C. a, Brück, W., Liebetanz, D., 2009. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.* 66, 355–65.
- Monte-Guedes, C.K.R., Alves, E.V.S., Viana-da-Silva, E., Guedes, R.C. A, 2011. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. *Neurosci. Lett.* 496, 191–4.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E., Resnick, O, 1978. The effects of protein malnutrition on the developping nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2,137-230.

- Nagano, M., Liu, M., Inagaki, H., Kawada, T., Suzuki, H., 2012. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. *Neuropharmacology* 63, 292–300.
- Neal, C.R., VanderBeek, B.L., Vázquez, D.M., Watson, S.J., 2003. Dexamethasone exposure during the neonatal period alters ORL1 mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and hippocampus of the adult rat. *Dev. Brain Res.* 146, 15–24.
- Neal, C.R., Weidemann, G., Kabbaj, M., Vázquez, D.M., 2004. Effect of neonatal dexamethasone exposure on growth and neurological development in the adult rat. *Am. J. Physiol.* 287, R375–85.
- Niu, Y., Herrera, E.A., Evans, R.D., Giussani, D.A., 2013. Antioxidant treatment improves neonatal survival and prevents impaired cardiac function at adulthood following neonatal glucocorticoid therapy. *J. Physiol.* 591, 5083–93.
- Nosedá R., Burstein R., 2013. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, CSD, sensitization and modulation of pain. *Pain. Dec*;154 Suppl 1
- Pandya, J.D., Agarwal, N.A., Katyare, S.S., 2007. Dexamethasone treatment differentially affects the oxidative energy metabolism of rat brain mitochondria in developing and adult animals. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 309–16.
- Shah, D.K., Boylan, G.B., Rennie, J.M., 2012. Monitoring of seizures in the newborn. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 97, F65–9.
- Shinwell, E.S., Karplus, M., Reich, D., Weintraub, Z., Blazer, S., Bader, D. Yurman, S., Dolfín, T., Kogan, A., Dollberg, S., Arbel, E., Goldberg, M., Gur, I., Naor, N., Sirota, L., Mogilner, S., Zaritsky, A., Barak, M., Gottfried, E., 2000. Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 83, 177–181
- Shrivastava, A., Lyon, A., McIntosh, N., 2000. The effect of dexamethasone on growth , mineral balance and bone mineralisation in preterm infants with chronic lung disease. *Eur J Pediatr* 159, 380–384.
- Smart, J.L., Dobbing, J., 1971. Vulnerability of developing brain. Vi. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 33, 303–314.
- Souza, T.K.M., e Silva, M.B., Gomes, A.R., de Oliveira, H.M., Moraes, R.B., de Freitas Barbosa, C.T., Guedes, R.C.A., 2011. Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats. *Exp. Brain Res.* 214, 463–9.
- Stark, A.R., Carlo, W.A., Tyson, J.E., Papile, L.-A., Wright, L.I.L., Shankaran, S., Donovan, E.F., Oh, W.I., Bauer, C.R., Saha, S., Poole, W.K., Stoll, B.J., 2001. Adverse effects of early dexamethasone treatment in extremely-low-birth-weight infants. *N. Engl. J. Med.* 344, 95–101.
- Sze, C., Lin, Y., Lin, Y., Hsieh, T., Kuo, Y.M., Lin, C., 2013. The Role of Glucocorticoid Receptors in Dexamethasone-Induced Apoptosis of Neuroprogenitor Cells in the Hippocampus of Rat Pups. *Mediators Inflamm.* 2013, 628094.
- Tijsseling, D., Camm, E.J., Richter, H.G., Herrera, E. A., Kane, A.D., Niu, Y., Cross, C.M., de Vries, W.B., Derks, J.B., Giussani, D. A., 2013. Statins prevent adverse effects of postnatal glucocorticoid therapy on the developing brain in rats. *Pediatr. Res.* 1–7.

- Torrente, D., Cabezas, R., Avila, M.F., García-Segura, L.M., Barreto, G.E., Guedes, R.C., 2014a. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? *Neurosci Lett.* 565, 2-6.
- Torrente, D., Mendes-da-Silva, R.F., Lopes, A.A.C., González, J., Barreto, G.E., Guedes, R.C.A., 2014b. Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. *Neurosci. Lett.* 558, 87–90.
- Unemura, K., Kume, T., Kondo, M., Maeda, Y., Izumi, Y., Akaike, A., 2012. Glucocorticoids Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression In Vitro and In Vivo. *J. Pharmacol. Sci.* 119, 30–39.
- Vázquez, D.M., Neal, C.R., Patel, P.D., Kaciroti, N., López, J.F., 2012. Regulation of corticoid and serotonin receptor brain system following early life exposure of glucocorticoids: long term implications for the neurobiology of mood. *Psychoneuroendocrinology* 37, 421–37.
- Wang, Y., Huang, C., Hsu, K., 2010. The role of growth retardation in lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. *PLoS One* 5, e12806.
- Williams, D.B., Wan, Z., Frier, B.C., Bell, R.C., Field, C.J., Wright, D.C., 2012. Dietary supplementation with vitamin E and C attenuates dexamethasone-induced glucose intolerance in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, R49–58.
- Yılmaz, T., Akça, M., Turan, Y., Ocak, H., Kamaşak, K., Yildirim, M., 2014. Efficacy of dexamethasone on penicillin-induced epileptiform activity in rats: an electrophysiological study. *Brain Res.* 1554, 67–72.
- Zhou, N., Rungta, R. L., Malik, A., Han, H., Wu, D. C., MacVicar, B. A., 2013. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1582-1594.
- Zuloaga, D.G., Carbone, D.L., Hiroi, R., Chong, D.L., Handa, R.J., 2011. Dexamethasone induces apoptosis in the developing rat amygdala in an age-, region-, and sex-specific manner. *Neuroscience* 199, 535–47.

7. CONCLUSÕES

Os resultados dessa dissertação de mestrado permitem-nos chegar a quatro conclusões principais:

- O tratamento neonatal com Dex acelera a propagação da DAC.
- Esse efeito parece ser permanente, ou pelo menos duradouro, uma vez que foi observado no cérebro já desenvolvido.
- A associação com vitaminas antioxidantes C e E abolem a ação da Dex sobre a DAC.
- Os tratamentos empregados não influenciaram significativamente a potenciação da atividade elétrica cortical espontânea associada à DAC.

Considerando os efeitos cerebrais adversos dos glicocorticoides no início da vida, é sugerido então que a terapia com Dex em organismos prematuros pode se beneficiar da coadministração de vitaminas antioxidantes. Entretanto, a extrapolação apropriada do cérebro do rato para o humano ainda requer futura investigação.

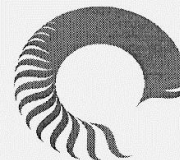
8. PERSPECTIVAS PARA FUTURAS PESQUISAS

- Avaliar os correlatos celulares dos presentes tratamentos, por meio de técnicas imuno-histoquímicas para marcação específica de astrócitos, micróglia e padrões de mielinização.
- Investigar se o efeito da Dex sobre a DAC é dependente da idade dos animais e da dose administrada.
- Analisar se a via de administração da Dex exerce influência sobre seus efeitos na DAC, estudando animais submetidos a aplicação tópica.
- Comparar a ação de diferentes glicocorticoides sintéticos sobre parâmetros associados à DAC.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 01 de outubro de 2012.

Ofício nº 486/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes**
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.028309/2012-28

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Interação dexametasona/vitaminas antioxidantes no cérebro em desenvolvimento: análise eletrofisiológica no rato albino”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - UFPE; Animais: Ratos Albinos; Sexo: machos; Idade: 1 a 70 dias; Peso: 5-6g (nascimento) até 250g (70 dias); Número de animais previsto no protocolo: 50

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

ANEXO 2 – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO A *BRAIN RESEARCH*

Andréia Lopes <lopesaac@gmail.com>

Fwd: Submission Confirmation

1 mensagem

Rubem Guedes <guedes.rca@gmail.com>
Para: Andréia Lopes <lopesaac@gmail.com>

3 de Julho de 2014 às 18:13

----- Forwarded message -----

From: Brain Research <bres@elsevier.com>
Date: 2014-07-03 18:06 GMT-03:00
Subject: Submission Confirmation
To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Dear Dr. Guedes:

Your submission, Neonatal administration of dexamethasone accelerates spreading depression in the developed rat cortex, and the antioxidant vitamins C and E counteract this effect., for Brain Research has been received by the Editorial Office and will be processed as soon as possible.

You may log onto EES as an Author to view your submission at any time by entering these login details:

<http://ees.elsevier.com/bres/>

Your username is: guedes.rca@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/BRES/automail_query.asp

EES can be reached at <http://ees.elsevier.com/bres/>. We would appreciate receiving any feedback you care to send us about this system, as our goal is to make the electronic submission process as expeditious and user-friendly as possible.

Kind regards,

The Brain Research Editorial Office