



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

DOUTORADO EM NUTRIÇÃO

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BASES EXPERIMENTAIS DA
NUTRIÇÃO**

THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUZA

**INTERAÇÃO NUTRIÇÃO-AGENTES ANESTÉSICOS:
EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS SOBRE A DEPRESSÃO
ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS ADULTOS**

**RECIFE-PE
2015**

THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUZA

**INTERAÇÃO NUTRIÇÃO-AGENTES ANESTÉSICOS:
EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS SOBRE A DEPRESSÃO
ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Profº Titular do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco
(UFPE)

**RECIFE-PE
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S729i Souza, Thays Kallyne Marinho de.
Interação nutrição-agentes anestésicos: efeitos eletrofisiológicos sobre a depressão alastrante cortical em ratos / Thays Kallyne Marinho de Souza. – Recife: O autor, 2015.
87 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Anestésicos. 2. Depressão alastrante cortical. 3. Hipoglicemia. 4. Lactação. 5. Potenciação de longa duração. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-057)

THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUZA

**INTERAÇÃO NUTRIÇÃO-AGENTES ANESTÉSICOS:
EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS SOBRE A DEPRESSÃO
ALASTRANTE CORTICAL EM RATOS ADULTOS**

Tese aprovada em: 24/02/15

Banca Examinadora:

Dra. Ângela Amâncio dos Santos / UFPE

Dra. Luciana Maria Silva de Seixas Maia/ UFPE

Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues/ UFPE

Dra. Maria Elisa Calcagnotto/ UFRGS

Dr. Pedro Valadão Carelli/ UFPE

Recife

2015.

Aos meus pais, Maria José e Miguel, à minha irmã, Tayana e ao meu querido Júnior. Vocês iluminaram o caminho da minha vida e souberam entender minha ausência e meus momentos de ansiedade durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor da Vida, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades;

À minha família, razão do meu viver, que sempre através do seu amor e confiança, contribui para meu enriquecimento pessoal e profissional. Em especial, minha mãe. Obrigada mãe, por tudo que você me deu e me ensinou. Obrigada pela sua generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. Não encontro palavras que consigam te agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Muito obrigada;

A Israel da Silva Júnior, pelo amor e cumplicidade. Obrigada pela compreensão e por estar ao meu lado, sempre incentivando, enfim, por acreditar em mim. Ter você ao meu lado, torna essa vida mais prazerosa;

À pequena Sofia Maria que mesmo sem saber muitas vezes devolveu o sorriso ao meu rosto e se tornou um dos maiores presentes concedidos por Deus;

Às amigas de longa data Edynara, Elian e em especial Mariana por ter desenvolvido comigo parte desse trabalho;

Agradeço a todos os professores que passaram por mim ao longo da minha vida e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional;

Minha gratidão ao professor Rubem Guedes, meu orientador, porque a ele devo, não apenas incontáveis indicações de preciosas leituras, mas, sobretudo, o fato de ter sempre sido um incansável e atencioso mestre. Como mestre, que entende do ofício de pesquisador, que tem paixão pelo conhecimento e que permanentemente acompanha os passos de seus aprendizes, ele foi o grande incentivador de minha vontade de pesquisar e de aprender. Agradeço por sua disponibilidade irrestrita e por ter acompanhando boa parte das minhas conquistas profissionais;

À querida psicóloga Flávia, pela profundidade do seu trabalho que me proporcionou um significativo crescimento humanístico, por sua presença marcante na busca do autoconhecimento. Receba meu respeito e admiração;

Àquelas pessoas que simplesmente aparecem em nossa vida e nos marcam para sempre. Obrigada por fazerem parte da minha história: Adriana Negromonte, Jenyffer Medeiros, Marília Ferreira Frazão, Luciana Maria Silva de Seixas Maia, Carla Mirella, Zaiin Marques, Rodrigo (Kiko), D. Verônica, Messias Júnior, Luciano e Wilson Silva;

Às minhas amigas: Danielle, Daniela, Heloisa, Claudete, Rebecca, Leila, Isis e Celina. Cada uma delas que nos momentos de dúvidas, angústias e dificuldades, tiveram sempre uma palavra de incentivo, agradeço eternamente;

Ao professor Marcelo pela colaboração no desenvolvimento do algoritmo para análise dos dados;

À professora Luciana Maia e ao Departamento de Histologia e Embriologia pela colaboração na análise histológica;

A todos os estagiários do LAFINNT, em especial Alice, Ana Jéssica e Marcela pela ajuda em vários momentos;

Aos amigos do LAFINNT, em especial Cássia Borges, pelas boas conversas e trocas de experiências e Andrea Lopes, pela sua disponibilidade em ajudar com alguns procedimentos técnicos;

Ao veterinário Edeones França, pelo fornecimento dos animais;

Aos funcionários do Departamento de Nutrição;

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que com seu apoio e estímulo tornaram possível a realização deste trabalho.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”.

Paulo Freire

RESUMO

A depressão alastrante cortical (DAC) caracteriza-se pela redução reversível da atividade elétrica no córtex cerebral, em consequência de um estímulo elétrico, mecânico ou químico de um ponto do tecido cerebral. Evidências experimentais sugerem que a DAC pode modular a excitabilidade neural e atividade sináptica, com possíveis implicações para potenciação de longa duração. Fatores sistêmicos como agentes anestésicos e hipoglicemia podem influenciar na propagação da DAC, bem como as condições de lactação dos animais. Nós investigamos a influência de dois tipos de agentes anestésicos (mistura de uretana+alfa-cloralose ou tribromoethanol) sobre os possíveis efeitos da DAC em aumentar a atividade eletrocorticográfica (ECoG), em ratos Wistar, machos e adultos que foram previamente submetidos a condições favoráveis e desfavoráveis de lactação. Adicionalmente, observamos se este efeito de potenciação pode ser modulado pela hipoglicemia induzida pela insulina. Os ratos foram previamente amamentados em ninhadas formadas por 6 e 12 filhotes (grupos L6 e L12, respectivamente, condições consideradas como favoráveis e desfavoráveis de lactação). Na vida adulta, nós avaliamos, em dois pontos corticais, o aumento na amplitude do eletrocorticograma após o tecido cortical ter sido exposto a DAC. Essa análise foi feita com o auxílio de um algoritmo implementado no software Matlab TM. Nossos dados indicam que os agentes anestésicos e as condições de lactação modulam a potenciação induzida pela DAC sobre a amplitude do ECoG e que a hipoglicemia induzida pela aplicação de insulina não modifica este efeito dos agentes anestésicos. Investigações futuras são necessárias para aprofundar a relevância desses achados na fisiopatologia de certas doenças neurológicas relacionadas com a excitabilidade cerebral, como as epilepsias.

Palavras chave: Anestésicos. Depressão alastrante cortical. Hipoglicemia. Lactação. Potenciação de longa duração.

ABSTRACT

Cortical spreading depression (CSD) is characterized by reversible reduction of the evoked and spontaneous electrical activity in the cerebral cortex subsequent to electrical, mechanical or chemical stimulation of one point of the cerebral tissue. Experimental evidence has suggested that CSD can modulate neural excitability and synaptic activity, with possible implications for the long-term potentiation. Systemic factors like anesthetic agents and hypoglycemia may influence CSD propagation, as well as the lactation conditions of the animal. We investigated the influence of two types of anesthetic agents (urethane + alpha-chloralose or tribromoethanol) on the possible effects of CSD in enhancing the electrocorticographic activity (ECoG) in adult male Wistar rats that were previously suckled in favorable and unfavorable conditions of lactation. Additionally, we observed whether this potentiation effect may be modulated by insulin-induced hypoglycemia. The rats were previously suckled in litters formed by 6 or 12 pups (termed L6 and L12 groups; considered respectively as favorable and unfavorable lactation condition). In adulthood, we evaluate the increase in amplitude of electrocorticogram after the cortical tissue had been exposed to CSD in two cortical points with the support of an algorithm implemented in Matlab TM software. In the L12 condition, the rats presented significantly lower body- and brain weights than L6 control rats. Our data suggest that anesthetic agents and lactation condition modulate the potentiation induced by CSD on the amplitude of the ECoG and that insulin-induced hypoglycemia does not modify the anesthetic agents' effect. We also confirmed the regional cortical difference in potentiation of ECoG in anesthetized animals. Further studies shall deeply investigate the relevance of these findings for certain neurological diseases related to brain excitability, such as epilepsy.

Keywords: Anesthetics. Cortical spreading depression. Hypoglycemia. Lactation. Long-term potentiation,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 – Comparação, no rato e no homem, dos períodos de desenvolvimento neural 18

Fig.2 – Ciclo de eventos durante a Depressão cortical alastrante 21

Tabela 1 – Descrição dos grupos estudados 30

Figuras do artigo 1

Fig.1 – Registros eletrofisiológicos e amplitudes do ECoG

Fig.2 – Registros eletrofisiológicos e amplitudes do ECoG do grupo hipoglicemia

Figuras do artigo 2

Fig.1 – Pesos corporais

Fig.2 – Registros eletrofisiológicos e amplitudes do ECoG

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS - Centro de Ciências da Saúde

DAC - Depressão Alastrante Cortical

ECoG – Eletrocorticograma

EEG - Eletroencefalograma

KCl - Cloreto de Potássio

LAFINNT - Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio

LTP - Potenciação de Longa Duração (do inglês “long term potentiation”)

NMDA - N-metil-D-aspartato

QI – Quociente de inteligência

SNC - Sistema Nervoso Central

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

VLV - Variação Lenta de Voltagem

5 HT – 5- hidroxitriptamina

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Alterações Nutricionais e Funções Cerebrais	17
2.2 Nutrição e Depressão Alastrante Cortical	21
2.3 Potenciação de longa duração (LTP), depressão alastrante, agentes anestésicos e hipoglicemia	24
3 JUSTIFICATIVA	28
4 PERGUNTA CONDUTORA	28
5 HIPÓTESES	29
6 OBJETIVOS	
6.1 Geral	29
6.2 Específicos	29
7 METODOLOGIA	
7.1 Animais	30
7.2 Determinações ponderais	32
7.3 Procedimento cirúrgico e registro eletrofisiológico	32
7.4 Análise Estatística	34
7.5 Eutanásia	34
8 RESULTADOS – Artigos originais	35
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	85

1 – APRESENTAÇÃO

A deficiência de um ou mais nutrientes na dieta pode perturbar a organização bioquímica e morfológica do cérebro de mamíferos, e isto é geralmente acompanhado de repercussões na sua função (GUEDES, 2011). Sob essas condições, distúrbios funcionais podem ser investigados por meio da atividade eletrofisiológica, que também pode ser bastante afetada em animais, tanto no sistema nervoso periférico (SILVA et al., 1987) como no central (MORGANE et al., 1978, 1993).

Em várias partes do mundo, a desnutrição continua sendo um dos fatores etiológicos mais comuns de morbimortalidade na população infantil. Estima-se que cerca de 9% das crianças com menos de 5 anos de idade estão em risco de morte ou de grave comprometimento do seu crescimento e desenvolvimento fisiológico e psicológico. Este problema de saúde pública é mais observado nos países em desenvolvimento, onde há populações em situação de vulnerabilidade. Apesar do Brasil ter experimentado nos últimos anos o processo de transição nutricional, caracterizado pelo declínio acentuado nas taxas de desnutrição infantil e aumento do excesso de peso, a superação definitiva do flagelo da desnutrição ainda não aconteceu (BATISTA-FILHO e RISSIN, 2003; FORRESTER et al., 2012; NICHOLS, 2012). Isso tem motivado o Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde CCS/UFPE, onde este trabalho científico foi desenvolvido, a estudar o tema (GUEDES, 2011). Este laboratório tem investigado, em modelos animais, os efeitos de variáveis nutricionais e não-nutricionais precoce sobre o sistema nervoso central adulto, bem como as suas repercussões na atividade elétrica cerebral, utilizando para isto o fenômeno conhecido como depressão alastrante cortical (DAC).

A DAC é um fenômeno neural que está relacionado com a excitabilidade do cérebro; foi experimentalmente descrito pelo neurocientista brasileiro Aristides Azevedo Pacheco Leão. Em seu estudo inicial, Leão (1944) já tinha observado a existência de ondas “anormais” no registro eletroencefalográfico, após a evocação da DAC. Por sua semelhança com as ondas registradas em pacientes epiléticos, foram denominadas de ondas “epileptiformes”, que mostram um aumento da excitabilidade neural e da atividade sináptica, evidenciadas pelo aumento da amplitude do eletrocorticograma (ECoG). Isto poderia sugerir uma relação entre a DAC e a potenciação de longa duração (LTP).

A LTP (do inglês “long term potentiation”) é outro fenômeno neural que foi observado inicialmente no hipocampo, no qual uma breve estimulação sináptica de alta frequência resulta em um aumento duradouro na eficácia sináptica (plasticidade neuronal), associado com aprendizagem e memória. Para uma revisão recente, sugere-se consultar Nicoll e Roche (2013).

Sabe-se que a restrição dietética acarreta efeitos profundos sobre a função cerebral e a vulnerabilidade a doenças. Ghadiri et al (2009) demonstraram, em ratos *in vitro*, que a excitabilidade neuronal pode ser alterada frente a um período de jejum. Esses autores relataram que a LTP foi significativamente maior no tecido cortical, mas foi inibida no tecido hipocampal; o limiar para deflagração da DAC foi também alterado.

Investigações sobre a DAC, *in vivo*, têm sido limitadas pela necessidade em se anestesiarem os animais. Agentes anestésicos têm profundos efeitos sobre os sistemas de neurotransmissores e também tem sido mostrado que alguns anestésicos inibem a DAC (KITAHARA, 2001; SAITO et al., 1995; GORELOVA et al., 1987).

Alguns trabalhos demonstraram que o fenômeno da DAC pode induzir um efeito semelhante à LTP *in vitro* (BERGER et al., 2008; FOOTITT e NEWBERRY, 1998), estudos *in vivo* sobre esse tema, ainda são raros. Especificamente, recentes estudos mostraram a ocorrência de uma potenciação sináptica *in vivo* (FARAGUNA et al., 2010; SOUZA et al., 2011). No entanto, esses autores não avaliaram se o uso de agentes anestésicos poderia ter influenciado tais resultados. Soma-se a isto o fato de que não há qualquer informação disponível na literatura acerca de efeitos dos agentes anestésicos sobre a potenciação associada à DAC. Por essas razões, torna-se importante a presente investigação, para tentar determinar se esse efeito observado em mamíferos *in vivo* após à DAC é modulado por diferentes estados de vigília (comparando-se animais acordados - sem o efeito de anestesia e animais anestesiados). Neste caso, tal efeito pode ser influenciado também pelo estado nutricional do organismo, uma vez que é sabido que a desnutrição no início da vida pode reduzir o número de células do cérebro e suas conexões, tanto em animais de laboratório como em humanos (MORGANE et al., 1978).

Além disso, nos últimos anos muitos avanços foram realizados nos estudos sobre a DAC, porém seus mecanismos finais ainda permanecem por serem desvendados. Postula-se uma conexão entre a DAC e doenças neurológicas de importância clínica, como a epilepsia, a enxaqueca com aura, a isquemia e o traumatismo cerebral. Compreender seus mecanismos

significa também conhecer como elas podem se desenvolver, e consequentemente como melhor tratá-las, o que justifica, mais uma vez, a relevância deste estudo.

Os resultados da presente investigação estão contidos em dois artigos originais, o primeiro foi submetido à revista “Neuroscience Letters”, intitulado de “*Anesthetic agents modulate ECoG potentiation after spreading depression, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect*”. O segundo foi submetido à revista “Life Sciences” com o título de “*Interaction between unfavorable lactation and anesthetic agents on the electrocorticogram potentiation after spreading depression in adult rats*”.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alterações Nutricionais e Funções Neurais

A alimentação e a nutrição adequadas são fatores que possibilitam a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano (PNAM, 2003). A disponibilidade e a utilização de nutrientes pelo organismo, associado ao aproveitamento energético celular determinam o estado nutricional do indivíduo. Assim, podemos considerar como estado nutricional normal quando a alimentação supre os nutrientes necessários ao metabolismo; caso contrário, surgem condições para o aparecimento de doenças carenciais ou a instalação dos excessos, quando há respectivamente deficiência ou excesso na disponibilidade de energia e nutrientes (BATISTA FILHO, 2003).

Nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, tem-se observado mudanças nos padrões de distribuição dos problemas alimentares, originando a chamada transição nutricional, caracterizada pela substituição de um problema alimentar – a desnutrição – por outro de natureza oposta – a obesidade (BATISTA FILHO e RISSIN, 2003). Apesar disso, a desnutrição ainda se constitui em um problema social grave. Estima-se que aproximadamente 55% das mortes infantis nos países em desenvolvimento ainda estão ligadas à desnutrição (PNAN, 2003). O mapa da fome da FAO (2014) relata que 13,5% da população dos países em desenvolvimento, isto é, uma em cada oito pessoas estão subnutridas (FAO, 2014).

Os riscos nutricionais, de diferentes categorias e magnitudes, permeiam todo o ciclo da vida humana, desde a concepção até a senescência. Quando incide em crianças, torna-se um problema de saúde pública, seja isolada ou associada a outros fatores que aumentam a morbimortalidade e frequentemente afetam a função cerebral (WARTELOW, 1997).

A desnutrição ou, mais corretamente, as deficiências nutricionais – porque são várias as modalidades de desnutrição – são condições que decorrem do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou, ainda, com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos. Geralmente, esse aproveitamento inadequado é motivado pela presença de outras doenças, em particular doenças infecciosas (MONTEIRO, 2003).

Cada sistema que integra o organismo necessita de tipos diferentes de nutrientes, com funções específicas, sendo necessária uma dieta variada, equilibrada e harmônica para que o organismo obtenha um bom funcionamento. Isto não é diferente para o sistema nervoso. A comunicação neuronal, através da síntese de neurotransmissores, requer elementos provenientes dos alimentos (MAIA e SANTOS, 2006).

Segundo Morgane, Mokler e Galler (2002), a deficiência nutricional corresponde a um dos principais fatores não genéticos que afetam o desenvolvimento cerebral. Este agravo nutricional é mais nocivo no início da vida, principalmente em relação ao sistema nervoso. Isto porque é neste período que os órgãos desse sistema estão crescendo e se desenvolvendo por meio dos processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização. Além disso, nessa fase os requerimentos nutricionais para síntese dos componentes celulares são maiores. A esse período de desenvolvimento e crescimento rápidos do sistema nervoso denomina-se período crítico ou de maior vulnerabilidade a vários tipos de agressões, como a desnutrição (DOBBING e SMART, 1974). Nessa fase ocorre também um aumento rápido do peso cerebral em decorrência do auge da neurogênese, gliogênese e migração neuronal. Conforme a espécie de mamífero, o período crítico ocorre em épocas distintas. Assim, nos seres humanos inicia-se no período pré-natal (último trimestre de gestação) e vai até os primeiros anos de vida pós-natal (2-4 anos); já no rato coincide com o período de aleitamento, isto é, as três primeiras semanas de vida pós-natal (SCRIMSHAW e GORDON, 1968). Os principais determinantes das consequências da carência nutricional sobre o sistema nervoso são: a duração e a intensidade da deficiência nutricional, bem como o estágio de desenvolvimento do órgão, na época em que ocorre a desnutrição (MORGANE et al., 1978; RANADE et al., 2008) (Figura 1).

No cérebro, a desnutrição durante o período de desenvolvimento pode acarretar certas mudanças como: alteração de atividades enzimáticas, maior densidade de empacotamento celular, diminuição do número de células e de lipídios, com prejuízo à mielinização (MORGANE et al., 1978).

Zhang et al (2013) tem mostrado que a deficiência nutricional prejudica as espinhas dendríticas nos neurônios corticais. Os autores sugerem que a desnutrição pode prejudicar a habilidade neuronal para formar conexões e sustentar as informações adquiridas nos dendritos. Assim, distúrbios na plasticidade sináptica podem alterar o processamento sináptico com modificações na atividade sináptica excitatória.

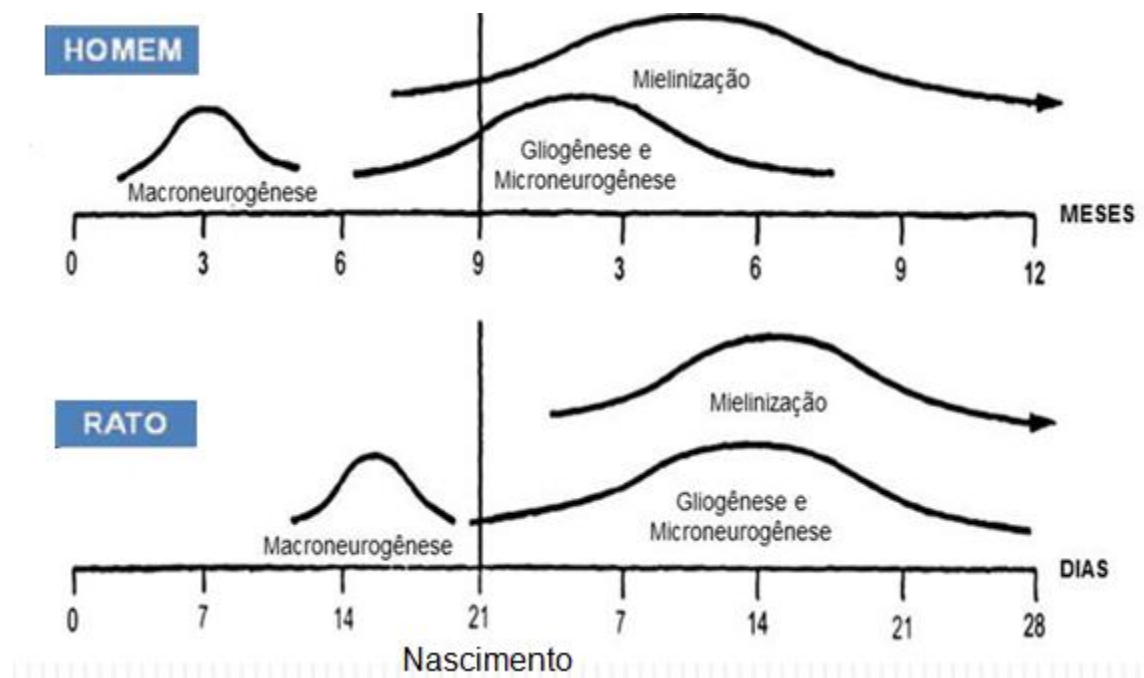


Figura 1 – Esquema comparando os períodos de desenvolvimento neural de humanos e de ratos. Figura modificada do artigo de MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002.

Estudos indicam que a maioria das alterações no crescimento de várias estruturas cerebrais eventualmente se recupera (até certo ponto), embora ocorram alterações permanentes no hipocampo e cerebelo (STRUPP e LEVITSKY, 1995).

Segundo Morgane et al (1993), as estruturas mais prejudicadas pela desnutrição durante o período de desenvolvimento cerebral são o bulbo olfatório, o hipocampo e o cerebelo. Essas áreas terminam sua formação logo após o nascimento, e estariam mais susceptíveis aos danos provocados pelos agravos nutricionais durante este período. O hipocampo corresponde a uma área do encéfalo que é especialmente importante na evocação e/ou formação de algumas formas de memória, sendo esta região a área onde a Potenciação de Longa Duração, objeto de interesse para o nosso estudo, é mais documentada (NICOLL e ROCHE, 2013).

Os processos de aprendizagem e memória são dependentes de numerosas interações de neurotransmissores que derivam de sistemas bioquímicos e metabólicos em várias partes do cérebro (MORGANE et al., 1993). Mudanças neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais podem ser provocadas por alterações nutricionais, acabando por repercutir na capacidade cognitiva, de memória e motivação do indivíduo (HACK et al., 1991; PIKANÇO-DINIZ, et al., 1998; RANADE et al., 2008; STRUPP e LEVITSKY, 1995).

Durante o período de desenvolvimento cerebral são formadas conexões sinápticas específicas, resultando em um circuito neuronal bastante organizado, do qual dependem fatores epigenéticos, ambientais e sensoriais (FRÍAS et al., 2010). Assim, uma nutrição adequada, sobretudo no início da vida, é de suma importância para o desenvolvimento do sistema nervoso (GUEDES, 2011). Mesmo alterações, em um único constituinte da dieta, como o caso de um aminoácido específico, a L-arginina, podem afetar o funcionamento do sistema nervoso central (FRAZÃO et al., 2008; MAIA et al., 2006). Há relatos na literatura de que as deficiências de outros nutrientes, como os ácidos graxos essenciais (ômega 3) e o iodo também acarretam prejuízos no desenvolvimento cerebral (BORBA et al., 2010, HETZEL, 1999; MIYAZAMA et al., 2010).

Vários modelos experimentais podem ser utilizados para se provocar a desnutrição. No presente trabalho, foi utilizada a técnica de manipulação do tamanho das ninhadas, a qual vem se mostrando bastante eficaz. Rocha-de-Melo et al (2006) relatam que esta técnica induz a desnutrição pelo aumento do número de filhotes que serão amamentados por uma única mãe. Morgane et al (1978) afirmam que neste caso a qualidade do leite é mantida, havendo prejuízo na quantidade ofertada a cada filhote, acarretando a deficiência nutricional.

Dentre as diferentes abordagens que podem ser utilizadas para a compreensão de como as alterações nutricionais podem prejudicar a funcionalidade do sistema nervoso, temos o estudo da atividade elétrica cerebral. Esta pode ser avaliada através da análise do eletroencefalograma (EEG), este, tanto em animais de laboratório como em humanos saudáveis, possui um padrão contínuo com geração de potenciais elétricos com certas amplitudes e frequências (GUEDES, 2005). Em ratos desnutridos, a frequência das ondas do EEG se mostrou alterada (CINTRA et al., 2002; FRÍAS et al., 2010; MORGANE et al., 1978). Okumura et al (2010) demonstraram, em crianças desnutridas que apresentaram baixo peso no início da vida pós-natal, que o padrão de maturação do EEG, o quociente de inteligência (QI) e a circunferência da cabeça são inferiores aos de crianças nutridas. Isto sugere que a deficiência nutricional precoce estaria causalmente relacionada com as alterações do desenvolvimento neural, nessas crianças. Grieve et al (2008) afirmam que o padrão do EEG difere, de maneira regional, entre crianças nascidas a termo e com baixo peso. Esses autores sugerem que quando o cérebro em desenvolvimento sofre algum prejuízo, este ocorre de forma específica, alterando a estrutura e função cerebrais. Além disso, crianças com baixo peso ao nascer podem apresentar anormalidades motoras, cognitivas, comportamentais e

emocionais. Soubasi et al (2009) sugerem que, em crianças prematuras, a idade gestacional é um fator condicionante para a maturação do EEG e desenvolvimento neural.

Diante das evidências acima documentadas, fica claro que as deficiências nutricionais afetam os aspectos neuroanatômicos, bioquímicos e eletrofisiológicos do cérebro. O registro eletrofisiológico do fenômeno conhecido como depressão alastrante da atividade elétrica cerebral (DAC) permite analisar a influência da manipulação nutricional sobre o funcionamento do sistema nervoso, à luz das evidências apresentadas a seguir.

2.2 Nutrição e Depressão Alastrante Cortical

O fenômeno conhecido como “depressão alastrante cortical”, ou abreviadamente DAC, foi descrito pela primeira vez por Leão (1944), quando realizava estudos sobre a epilepsia experimental, na superfície do córtex cerebral de coelhos anestesiados. Leão observou que estímulos elétricos, químicos ou mecânicos em um ponto do tecido cortical provocam uma resposta caracterizada por uma depressão acentuada da atividade elétrica espontânea e evocada do ponto cortical estimulado. Esta depressão durava alguns minutos e se propagava de forma concêntrica por todo o córtex, com uma velocidade de 2 a 5 mm/min. À medida que a DAC se propaga para regiões cada vez mais afastadas, a atividade elétrica do ponto inicialmente estimulado começa a se recuperar, também de forma concêntrica. Ao final de cerca de cinco a dez minutos todo o tecido cortical se recupera (GUEDES, 2011).

Na região cortical invadida pela DAC observa-se o surgimento de uma variação lenta de voltagem (VLV): enquanto o ECoG diminui sua amplitude, o córtex torna-se mais negativo em relação a um ponto de voltagem fixa. Essa variação negativa, cuja amplitude situa-se entre -5 e -20 mV, é em geral seguida, e ocasionalmente precedida, de uma fase positiva de menor amplitude (LEÃO, 1947; 1961) (Figura 2).

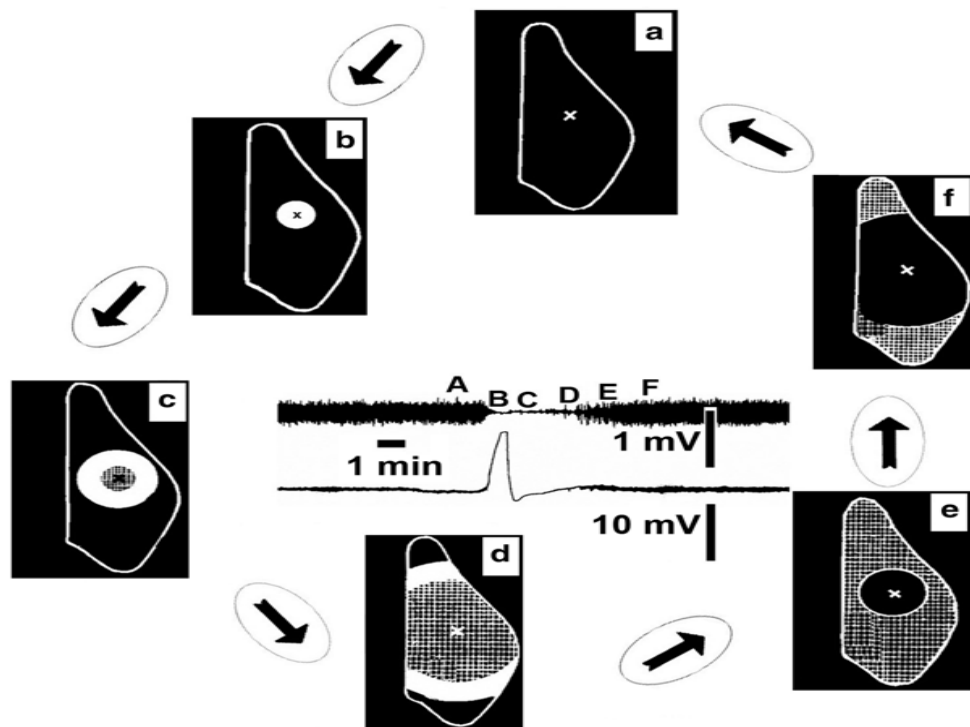


Figura 2-Ciclo de eventos reversíveis que ocorrem durante a depressão alastrante cortical (DAC). Sequência de passos (A-F) que ilustram o “ciclo de depressão alastrante cortical” no córtex cerebral do rato. Em A, um ponto do tecido cortical é estimulado (X) e um episódio de DAC é deflagrado. O círculo branco marcado em B mostra a área inicialmente deprimida, com consequente propagação, de forma concêntrica para outras áreas do córtex (pontos C e D). O círculo em preto mostrado em E indica a área inicialmente recuperada após a DAC. A recuperação é gradativa e também ocorre de forma concêntrica e se estende para áreas remotas (passo F) e finalmente o tecido cortical retorna à condição inicial pré-DAC, como em A. A área quadriculada representa a refratariedade cortical a uma nova estimulação após a DAC, e antes da total recuperação. Ao centro, é mostrado o eletrocorticograma (ECoG) com a variação lenta de potencial (VLV) da DAC. Nota-se, no eletrocorticograma, a redução da amplitude das ondas eletrográficas, no momento em que ocorre a VLV (B, C e D), característica da DAC. A depressão do ECoG se recupera totalmente após cerca de 3-5 minutos. Os pontos temporais correspondentes às condições dos passos A-F, são marcados no ECoG com as respectivas letras (Adaptado de GUEDES, 2011).

Quanto à sua ocorrência, a DAC tem sido demonstrada não só em córtex cerebral de aves, répteis e anfíbios, como também no cérebro de mamíferos, incluindo o homem. O fenômeno já foi evidenciado em várias estruturas do Sistema Nervoso Central (SNC) como núcleo caudado, tubérculo quadrigêmio, bulbo olfatório, córtex cerebelar, teto óptico e medula espinhal (BERGER et al., 2008; FIFKOVA et al., 1961; GORJI e SPERCKMANN, 2004; GUEDES et al., 2005; LEÃO e MARTINS FERREIRA, 1958, 1961; STREIT, FERREIRA-FILHO e MARTINS-FERREIRA, 1995).

A criação de situações experimentais que possam vencer ou reforçar a oposição natural do tecido à DAC pode oferecer dados de muita valia para a compreensão deste insólito fenômeno, cuja importância clínica reside no fato do mesmo estar relacionado a algumas doenças neurológicas humanas, como injúria cerebral, enxaqueca e isquemia cerebral (DREIER et al., 2011; SOMJEN et al., 1992; TORRENTE et al., 2014). Isto é verdadeiro, inclusive, no que se refere ao aumento, pós-DAC, da atividade elétrica do tecido neural, semelhante à potenciação de longa duração. O LAFINNT tem demonstrado que algumas condições de interesse clínico podem aumentar a susceptibilidade cortical à DAC, aumentando a sua velocidade de propagação. Dentre essas condições, têm-se a desnutrição (ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997), a hipoglicemia (COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001), o consumo de etanol (GUEDES e FRADE, 1993) o hipertireoidismo (SANTOS, 2000), bem como a deafferentação sensorial (TENÓRIO et al., 2009), o tratamento com ácido doses elevadas de ascórbico (MENDES-DA-SILVA et al., 2014; MONTE-GUEDES et al., 2011), com L-arginina (MAIA et al., 2009), com L-glutamina (LIMA et al., 2009), com dipirona (AMARAL et al., 2009), com Glutamato monossódico (LIMA, et al, 2013), com drogas que diminuem a atividade serotoninérgica (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013) e com tratamentos que facilitam a passagem do íon Cálcio através da membrana neuronal (TORRENTE, et al., 2014).

Por outro lado, há outras situações em que a velocidade de propagação do fenômeno torna-se menor, como é o caso do envelhecimento (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; GUEDES et al., 1996), da hiperglicemia (COSTA-CRUZ et al., 2006), da facilitação da atividade serotoninérgica (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; GUEDES et al., 2002), do uso de anestésicos (GUEDES e BARRETO, 1992), do exercício físico (MONTEIRO et al., 2011; LIMA et al., 2014) e da ação dos hormônios ovarianos (ACCIOLY et al., 2012).

Em seu estudo inicial, Leão (1944) demonstrou o surgimento de uma atividade elétrica cortical **epileptiforme** associada à DAC, sugerindo um aumento da excitabilidade neural e da atividade sináptica evidenciadas pelo aumento da amplitude do ECoG (LEÃO, 1944). Isto poderia sugerir uma relação entre a DAC e a LTP, como relatado a seguir.

2.3 Potenciação de longa duração (LTP), depressão alastrante, agentes anestésicos e hipoglicemia

Mudanças na eficácia das conexões sinápticas, referentes a um mecanismo relacionado aos processos de aprendizagem e memória, foram propostos por Cajal no início do século passado e formulado em um modelo sináptico por Hebb em 1949. Para uma revisão, sugere-se YANG e CALAKOS (2013) e NICOLL e ROCHE (2013). Assim, a LTP foi observada inicialmente no hipocampo e continua a ser estudada mais facilmente nessa região do cérebro que está envolvida com os processos referidos anteriormente (NICOLL e ROCHE, 2013, YANG e CALAKOS, 2013). Este fenômeno corresponde a um aumento persistente na intensidade sináptica (plasticidade neuronal), após uma breve estimulação elétrica de alta frequência (NICOLL e ROCHE, 2013).

A LTP no hipocampo tem sido reconhecida como um modelo muito utilizado em estudos de plasticidade sináptica no cérebro de mamíferos, plasticidade esta que é considerada uma propriedade fundamental no sistema nervoso. Apesar dos progressos realizados, para elucidar seus mecanismos de indução e expressão, os fatores responsáveis pelo aumento prolongado da eficácia sináptica no cérebro ainda permanecem por serem desvendados (ANWYL, 2009). Johnstone e Raymond (2011) sugeriram que a LTP ocorre nas diferentes regiões do hipocampo de forma distinta, em função de diferentes mecanismos de indução e expressão, apoiando a existência de múltiplos tipos de LTP.

Diferentes moduladores agem sobre diferentes cascatas de sinalização celular e podem influenciar a magnitude final, bem como a duração da LTP. O fator neurotrófico derivado do cérebro (“Brain derived neurotrophic factor” - BDNF), a adenosina e o óxido nítrico são alguns dos moduladores que podem influenciar este fenômeno neural. A LTP só ocorre em condições normais quando as sinapses ativadas por estimulação aferente provocam uma despolarização suficiente para induzir um desbloqueio nos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA) (LYNCH et al., 2007).

O realce da eficácia sináptica observado no fenômeno da LTP é classicamente induzido por uma breve estimulação elétrica de alta frequência *in vivo* e *in vitro*, mas pode ser também induzida por uma breve exposição ao KCl – o que também pode desencadear a DAC (GUEDES et al., 2005). Além do hipocampo, este fenômeno pode ser também observado em

outras regiões como no neocórtex. Footitt e Newberry (1998) demonstraram *in vitro* (fatia de neocórtex de rato) que a DAC induz uma potenciação da atividade evocada eletricamente, com características semelhantes à LTP. Guedes et al (2005) demonstraram a ocorrência deste fenômeno *in vivo* no teto óptico de vertebrado não-mamífero (rã). Faraguna et al (2010) também demonstraram um aumento na eficácia sináptica *in vivo* disparada pela DAC.

Em estudo anterior (SOUZA et al., 2011) demonstramos, em ratos anestesiados, que a DAC induz um efeito semelhante à LTP, *in vivo*, a julgar pelos aumentos das amplitudes dos registros eletrocorticográficos. Nos três grupos nutricionais analisados, nutrido, desnutrido durante o período de aleitamento e na idade adulta, houve um aumento de cerca de 22%, 23% e 13%, respectivamente, na amplitude do ECoG em relação aos valores pré DAC. Esses percentuais de aumento mostram-se próximos ao encontrados por Guedes et al (2005). No entanto esse fenômeno de potenciação associada à DAC não tem sido investigado na ausência de anestesia.

O uso de agentes anestésicos é essencial na prevenção e alívio da dor associada a procedimentos cirúrgicos, deprimindo de forma contínua o sistema nervoso central (SNC) e alterando o padrão eletroencefalográfico. Sendo assim, os anestésicos não só desempenham um papel importante na geração dos resultados de investigações científicas como também podem influenciar a interpretação dos dados da pesquisa, introduzindo mais uma variável ao estudo das funções cerebrais. A seleção adequada dos anestésicos exige não só conhecimento sobre os mesmos, como também sobre as diferentes vias de administração e mecanismos de ação (REID et al., 1999; SAITO et al., 1995). Segundo Maheras e Gow (2013) os anestésicos mais utilizados em roedores são os barbitúricos, coquetéis esteroides e agentes dissociativos.

Evidências experimentais demonstram que alguns anestésicos aumentam a inibição sináptica mediada pelo GABA e deprimem a transmissão excitatória mediada pelo glutamato. O aumento da inibição ocorre pelo prolongamento das correntes pós-sinápticas. Em contraste, a depressão da transmissão sináptica excitatória pode resultar da diminuição na liberação de neurotransmissores (KENDIG et al., 1991; MAC DONALD e OLSEN, 1994; MCIVER et al., 1991; PEROUANSK et al., 1995; TANELIAN et al., 1993; ZIMMERMAN et al., 1994).

Vários anestésicos são aplicados nas pesquisas neurofisiológicas, dentre eles temos a uretana, a alfa-cloralose e o tribromoetanol (CHOUDHURI et al., 2002; DEVONSHIRE et al., 2010; KUDO et al., 2008; MAIA et al., 2009; MUHAMMAD et al., 2008). Apesar dos mecanismos de ação da uretana serem poucos conhecidos, Hara e Harris (2002) sugerem que

este anestésico pode modular a atividade em vários receptores, agindo, ao contrário de outros agentes anestésicos, sobre ambos os sistemas excitatórios e inibitórios. Assim, a suposição de que as respostas produzidas por manipulações farmacológicas e fisiológicas em animais anestesiados com uretana são as mesmas daquelas produzidas em animais não anestesiados pode não ser válida, uma vez que a uretana pode alterar significativamente vários sistemas de neurotransmissores no SNC (HARA E HARRIS, 2002). Segundo Tian et al (2012) a uretana não interage substancialmente com os receptores pós sinápticos de glutamato, mas os efeitos ocorrem na supressão da transmissão sináptica sobre estes neurônios, ao reduzir a liberação de glutamato nos sítios pré sináptico e alterar a função das correntes de potássio. Juntos, esses dados sugerem que a concentração de uretana necessária ao ato cirúrgico induz uma significativa supressão na atividade excitatória dos neurônios e esta supressão está relacionada com a liberação de neurotransmissores excitatórios e correntes de potássio.

A alfa-cloralose é um agente hipnótico que apresenta como metabólitos ativos o tricloroetanol e o hidrato de cloral e também pode aumentar a atividade do receptor Gabaérgico (GARRET e GAN, 1998; KUDO et al., 2008).

O tribromoetanol é considerado uma droga segura amplamente usada em procedimentos cirúrgicos com animais, sobretudo roedores; induz uma inconsciência e supressão de reflexos rapidamente, uma vez que seu início de ação, bem como o período de recuperação são bem rápidos, permitindo uma anestesia por um período mais curto e também é usado no registro da DAC (CHOUDHURI et al., 2002; REID et al., 1999; MAHERAS e GOW, 2013). Este anestésico parece induzir um aumento dos efeitos inibitórios da 5-hidroxitriptamina (5-HT) (BRADLEY e DRAY, 1973), e também pode reduzir as respostas auditivas em camundongos (MAHERAS e GROW, 2013).

No LAFINNT a mistura de uretana+alfa-cloralose é muito usada para o estudo da DAC, porque produz um nível estável de anestesia por várias horas, ideal para experimentos agudos. Além disso, ao contrário de outros agentes anestésicos como a ketamina (GORELOVA et al., 1987), e halotano, isoflurano e sevoflurano (KITAHARA et al., 2001) e como o éter, (VAN HARREVELD e STAMM, 1953), que foi utilizado no século passado como agente anestésico, a mistura de uretana+alfa-cloralose não bloqueia a propagação desse fenômeno (KAZERANI e FURMAN, 2006; GUEDES e BARRETO, 1992). Investigações sobre a DAC, *in vivo*, têm sido limitadas pela necessidade em se anestésiar os animais. Os agentes anestésicos podem alterar os sistemas de neurotransmissores e, além disso, há relatos da inibição da DAC por anestésicos voláteis (KITAHARA, 2001; SAITO et al., 1995). Guedes e Barreto (1992) demonstraram, *in vivo*, que o uso da mistura de uretana+alfa-

cloralose, influencia a DAC, diminuindo a sua velocidade de propagação, em comparação com o animal acordado. Outros autores também demonstraram que os anestésicos modulam a DAC (KUDO et al., 2008; SAITO et al., 2005). Engstrom et al (1990) demonstraram que o limiar para o disparo da potenciação de longa duração pode ser alterado quando os animais são anestesiados pela uretana. Dringenberg et al (1996) relatam que este anestésico tem profundo efeito anti-serotoninérgico, bloqueando receptores específicos.

Além dos anestésicos, outros fatores como a hipoglicemia induzida pela aplicação de insulina podem influenciar no fenômeno da DAC (COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001; HOFFMANN et al., 2013; XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991). Durante a DAC há um aumento na utilização de glicose no tecido cerebral, ocasionando uma rápida e considerável redução nos níveis de glicose tecidual (SHINOHARA et al., 1979). Além disso, Sadgrove et al., 2007 mostraram que baixos níveis de glicose podem prejudicar a indução e a manutenção da LTP em fatias hipocâmpais.

A descoberta de receptores de insulina no cérebro (HAVRANKOVA et al., 1978) foi acompanhada também do aumento do interesse em investigar o possível envolvimento da insulina em certos processos neurais de importância para os humanos como a plasticidade sináptica (VAN DER HEIDE et al., 2006). Adicionalmente, uma relação causal entre a ação deficiente da insulina sobre o cérebro e distúrbios neurológicos importantes, como aqueles envolvidos com a cognição, aprendizagem e memória e a doença de Alzheimer tem sido reportados (DINELEY et al., 2014).

Portanto, parece clara a necessidade de se investigar se os efeitos da DAC sobre a potenciação do ECoG também sofrem influência de agentes anestésicos, e se esse efeito seria modulado pelo estado nutricional e pela hipoglicemia induzida pela insulina.

Sabe-se que a DAC é gerada por uma despolarização simultânea de várias células e que a comunicação intracelular tem um importante papel neste fenômeno, que pode ser afetado por agentes anestésicos (SAITO et al., 1995). Assim, pretendeu-se estudar os possíveis efeitos, de potenciação da amplitude do eletrocorticograma, produzidos pela DAC, em ratos nutridos e desnutridos, sob a ação de diferentes anestésicos, comparando-os a animais em vigília, com os objetivos enunciados abaixo (item 6).

3 – JUSTIFICATIVA

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que o fenômeno da DAC pode induzir um efeito semelhante de potenciação eletrofisiológica *in vitro*, ainda são raros os estudos *in vivo* sobre esse tema. Além disso, nenhuma informação está disponível na literatura acerca de efeitos dos agentes anestésicos sobre a potenciação que ocorre após a DAC. Por essas razões, torna-se importante a presente investigação, para tentar determinar se esse efeito observado em mamíferos *in vivo* é modulado por diferentes estados de vigília (comparando-se animais acordados - sem o efeito de anestesia e animais anestesiados). Neste caso, tal efeito poderia ser influenciado também pelo estado nutricional do organismo, uma vez que é sabido que a desnutrição no início da vida pode reduzir o número de células do cérebro e suas conexões, tanto em animais de laboratório como em humanos (MORGANE et al., 1978).

Além disso, nos últimos anos muitos avanços foram realizados nos estudos sobre a DAC, porém seus mecanismos finais ainda permanecem por serem desvendados. Postula-se uma conexão entre a DAC e doenças neurológicas de importância clínica, como a injúria cerebral, a epilepsia, a enxaqueca com aura e a isquemia cerebral. Compreender seus mecanismos significa também conhecer como elas podem se desenvolver, o que justifica, mais uma vez, a relevância deste estudo.

4 – PERGUNTA CONDUTORA

Como se daria a interação entre agentes anestésicos e alterações nutricionais na modulação da eficácia sináptica cortical deflagrada pela DAC?

5 – HIPÓTESES

- ⇒ A relação entre DAC e a potenciação da atividade elétrica varia conforme o nível de consciência dos animais (anestesiado ou acordado).
- ⇒ O estado nutricional do animal no início da vida (aleitamento) modula posteriormente (vida adulta) essa potenciação na amplitude do ECoG causada pela DAC.
- ⇒ O efeito de potenciação da atividade elétrica associado a DAC é modulado pela hipoglicemia induzida pela administração de insulina.

6 – OBJETIVOS

6.1 Geral

Investigar a influência de dois agentes anestésicos (mistura de uretana+alfa-cloralose ou tribromoetanol) sobre os possíveis efeitos da DAC em potenciar a atividade eletrocorticográfica, em ratos adultos machos previamente submetidos a condições favoráveis (ninhadas com 6 filhotes) e desfavoráveis de lactação (ninhadas com 12 filhotes).

6.2 Específicos

- ⇒ Acompanhar a evolução ponderal dos animais estudados, como indicador do estado nutricional;
- ⇒ Avaliar o peso cerebral, na vida adulta, como indicador dos efeitos da restrição nutricional sobre o seu desenvolvimento;
- ⇒ Caracterizar o impacto dos dois agentes anestésicos estudados sobre a potenciação da atividade elétrica cortical induzida pela DAC;
- ⇒ Verificar se a hipoglicemia induzida pela aplicação de insulina pode modular o efeito de potenciação após a DAC;
- ⇒ Verificar se os efeitos eletrofisiológicos dos agentes anestésicos e dos estados nutricionais apresentam interação.

7 – MÉTODOS

7.1 Animais

Foram estudados ratos machos, da linhagem Wistar (n=86), provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos durante todo o experimento em caixas de polipropileno, em sala com temperatura ambiente de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12h (início da fase clara às 6:00h).

As normas recomendadas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (Bethesda, USA) para o manejo e cuidados dos animais de laboratório foram seguidas. Os procedimentos experimentais a seguir descritos foram realizados no LAFINNT e foram aprovados pelo comitê de ética para a pesquisa animal (protocolo nº 23076.021545/2011-32 – ANEXO 1). Os animais constituíram 10 grupos experimentais, dos quais seis grupos foram resultantes da combinação de três condições do fator “anestesia” ([1] mistura de 1g/kg de uretana+ 40 mg/kg de alfa-cloralose i.p. (**grupo U+C**) ; [2] tribromoetanol a 1,25%; 2 ml/100g i.p., correspondendo à dose de 250mg/kg (**grupo TBE**); [3] sem anestesia (**grupo Acordado**) – animais acordados) com duas condições nutricionais durante o aleitamento ([1] L6: amamentado em ninhadas de 6 filhotes - condição favorável de aleitamento; [2] L12: amamentado em ninhadas de 12 filhotes - condição desfavorável de aleitamento, como descrito anteriormente (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; ROCHA DE MELO et al., 2006). (tabela 1).

Três grupos adicionais de animais L6, (um anestesiado com U+C, outro, com TBE e outro acordado) constituíram controles que foram registrados sem que se deflagrasse a DAC. Finalmente, um grupo (L6, U+C) foi submetido à hipoglicemia pela injeção de insulina durante o registro eletrofisiológico (grupo Hipoglicemia). Estes animais tiveram sua glicemia avaliada no início do registro (glicemia basal) e após a DAC, através de glicosímetro da marca G-TECH®; para isso, uma gota de sangue da cauda foi aplicada sobre uma fita reagente que, inserida no glicosímetro, fornecia a leitura da glicemia. Nestes animais, a primeira hora do registro ocorreu sem a aplicação do KCl (registro basal); na segunda hora o KCl foi aplicado, conforme descrito posteriormente, e a glicemia foi aferida; na terceira hora os animais receberam uma dose de insulina Lispro, Humalog® 3,0-4,0 U/kg (correspondendo

a 105 - 140 $\mu\text{g/kg}$) em 0,2-0,4ml solução de Ringer e novamente tiveram sua glicemia avaliada. A análise da glicemia final foi realizada durante a quarta hora de registro.

Todos os animais, após o período de desmame, receberam a dieta de manutenção do biotério (“Presence ratos e camundongos” – composição especificada no rótulo do produto), com 23% de proteína em quantidades suficientes para garantir o consumo *ad libitum* até a realização dos registros eletrofisiológicos. Estes ocorreram, em todos os grupos, entre 90-120 dias.

Tabela 1. Descrição dos dez grupos experimentais de acordo com as condições de anestesia e lactação, bem como da presença ou ausência da depressão alastrante. O número de ratos por grupo está indicado nos parênteses.

Grupos	Condições de anestesia	Condições de lactação	Deflagração da DAC
1. U+C (n=13)	Uretana + alfa-cloralose	L6	Sim
2. U+C (n=11)	Uretana + alfa-cloralose	L12	Sim
3. TBE (n=7)	Tribromoetanol	L6	Sim
4. TBE (n=13)	Tribromoetanol	L12	Sim
5. Acordado (n=10)	Sem anesthesia	L6	Sim
6. Acordado (n=10)	Sem anesthesia	L12	Sim
7. Hipoglicemia (n=5)	Uretana + alfa-cloralose	L6	Sim
8. U+C/sem DAC (n=6)	Uretana + alfa-cloralose	L6	Não
9. TBE/sem DAC (n=6)	Tribromoetanol	L6	Não
10. Acordado/sem DAC (n=5)	Sem anesthesia	L6	Não

DAC = depressão alastrante cortical; U+C = uretana+alfa-cloralose; TBE = tribromoetanol; L6= condição favorável de aleitamento; L12= condição desfavorável de aleitamento.

7.2 Determinações ponderais

Os pesos corporais foram aferidos com auxílio de balança eletrônica da marca Filizola (capacidade de 3,0 Kg e escala em divisão de 0,5g), aos 30, 60 e 90 dias de vida. O peso do encéfalo de alguns animais foi obtido ao término do registro eletrofisiológico, imediatamente após a eutanásia, sendo o mesmo removido mediante 2 incisões: uma anterior, no limite entre os hemisférios cerebrais e o bulbo olfatório, excluindo-o; a outra incisão foi realizada posteriormente, tangenciando a borda inferior do cerebelo, incluindo-o. Os encéfalos foram pesados em balança analítica (“Bosh S-2000”, com sensibilidade até 0,1 mg), obtendo-se o chamado peso do encéfalo úmido. Em seguida foi colocado em uma estufa (marca Fanem) a 100°C e pesados a cada 1 ou 2 dias na mesma balança acima citada, até atingirem peso constante, considerado o peso do encéfalo seco.

7.3 Procedimento cirúrgico e registro eletrofisiológico

Para realização dos registros eletrofisiológicos da DAC na condição “sob anestesia”, os animais do grupo U+C e TBE foram anestesiados com os respectivos anestésicos. Para o registro na condição acordado, os eletrodos foram implantados, 24 a 48hs antes, sob anestesia com TBE. Neste caso, os animais tiveram seus crânios expostos através de uma incisão mediana no couro cabeludo. Um retângulo do osso parietal direito (4X2 mm) foi removido com o auxílio de uma broca Beltec – LB 100, e substituído por retângulo de placa acrílica transparente, com dois orifícios nos quais foram fixados os eletrodos de registro. Essa placa transparente permitiu o posicionamento dos eletrodos, sob visualização direta, de modo que o contato entre a ponta do eletrodo e a superfície cortical foi otimizado. A dura mater foi mantida intacta. Um parafuso de aço inoxidável (1 mm diâmetro) foi preso ao crânio do animal para permitir uma melhor fixação do cimento acrílico dental, utilizado para fixar a placa com os eletrodos na posição de registro (ver parágrafo seguinte). Os animais permaneceram por aproximadamente 30 minutos no aparelho estereotáxico para a estabilização da preparação. Em seguida foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno, onde se recuperaram da cirurgia de implantação dos eletrodos.

Durante todo o registro o animal anestesiado foi mantido sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável a fim de que a temperatura retal se mantivesse estável. Em dois pontos

da superfície do córtex parietal, foi registrada a atividade elétrica cortical espontânea (ECoG), por um período contínuo de quatro horas e trinta minutos. Foram utilizados três eletrodos, sendo um de referência comum, colocado no hemisfério cerebral contralateral ao hemisfério de implantação dos eletrodos, e os outros dois de registro, alinhados no sentido ântero-posterior. Todos os eletrodos foram do tipo “prata-cloreto de prata”, obtidos por eletrólise. Após serem cloretados, os fios de prata (20 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro) foram imersos em pipetas de polietileno (com pontas de 0,5 mm de diâmetro interno), preenchidas com solução de Agar Ringer a 0,5%. Um par dessas pipetas foi colocado em contato com a superfície cortical do hemisfério cerebral direito, para o registro do ECoG. O orifício de estimulação foi circundado por um anel plástico (5 mm de altura e 4 mm de diâmetro) e todo o conjunto (anel e eletrodo) foi fixado ao crânio com cimento acrílico (Simplex). Ao término do procedimento, o orifício de estimulação foi preenchido com óleo mineral e vedado com cera de osso ou algodão. Além disso, após o procedimento de implantação dos eletrodos, os animais do grupo acordado receberam uma dose de antibiótico (benzetacil 30 UI, i.m.) e 5 ml de solução salina contendo 0,25 g de glicose (1ml para cada 100g de peso corporal). Os registros eletrofisiológicos do grupo acordado foram realizados entre 24-48h após este procedimento cirúrgico, quando o animal já estava recuperado da anestesia inicial necessária à implantação dos eletrodos.

Para o registro, os eletrodos foram conectados a um sistema digital de registro (Biopac MP100, USA), que digitaliza e armazena os registros em computador, para posterior análise. Foram registrados o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de potencial DC (esta última característica da DAC). Amostras de aproximadamente 10 minutos de registro foram analisadas, *off-line*, com auxílio de um algoritmo implementado no *software* MATLAB™ versão R2011B. Esse algoritmo calcula a amplitude média das ondas do ECoG.

As duas primeiras horas do registro transcorreram sem a deflagração da DAC (não foi realizada a estimulação com KCl). Na terceira hora do registro, a DAC passou a ser provocada, no orifício de estimulação, pela aplicação de uma pelota de algodão embebida em KCl a 4% (aproximadamente 0,5M), que permaneceu em contato com a superfície cortical por 30 minutos. Durante esse período, episódios sucessivos de DAC foram deflagrados pelo KCl. Após esse período, a pelota de algodão com o KCl foi removida, cessou a deflagração da DAC e o registro prosseguiu por mais duas horas. Foram comparadas as amplitudes do ECoG antes e após a presença da DAC, como base para analisar a ocorrência da potenciação da atividade elétrica espontânea e os efeitos dos agentes anestésicos.

Após a realização dos registros eletrofisiológicos, alguns animais, tiveram seus encefalos removidos e conservados em álcool a 70%, para serem emblocados (cortes longitudinais de 50µm de espessura). O preparo das respectivas lâminas para análise histopatológica ocorreu sob coloração de Hematoxilina-Eosina, com o objetivo de verificar possíveis danos corticais provocados pelo procedimento de implantação dos eletrodos.

7.4 Análise Estatística

As diferenças entre os grupos L6 e L12, nos pesos corporais e encefálicos, foram comparadas usando o Teste t não-pareado. Para cada animal, os valores das amplitudes do ECoG antes e após a DAC foram normalizados e expressos em unidades relativas. As diferenças nessas amplitudes, antes e após a DAC, foram analisadas utilizando o Teste t pareado. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que $p < 0,05$. Comparações intergrupos foram realizadas mediante ANOVA seguida do teste de Mann-Whitney ou Dunn, quando indicado.

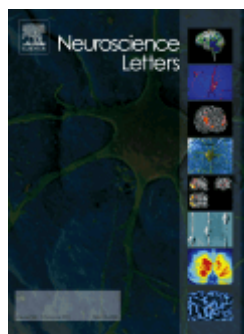
7.5 Eutanásia

Ao final da sessão de registro, estando o animal ainda anestesiado (os animais do grupo A foram anestesiados após o término da sessão de registro), foi introduzido um estilete metálico na região bulbar, através da *cisterna magna*, provocando-se lesão dos centros de controle cardio-respiratórios, com imediata parada da respiração, seguida por parada cardíaca (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012).

8 - RESULTADOS – Artigos Originais

8.1 Artigo 1

Title: Anesthetic agents modulate ECoG potentiation after spreading depression, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect



Authors: Thays Kallyne Marinho de **Souza**¹, Mariana Barros e **Silva-Gondim**¹, Marcelo Cairrão Araújo **Rodrigues**², Rubem Carlos Araújo **Guedes**^{1CA}.

Affiliation: ¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco,
BR-50670901, Recife - Pernambuco, Brazil.

²Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco,
BR-50670901, Recife - Pernambuco, Brazil.

^{CA} (Corresponding author): Prof. Rubem C.A. Guedes; Dept. of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, BR-50670901, Recife Pernambuco, Brazil.

Phone: +55- 81-21268936; **FAX:** +55-81-21268473

E-mails: (1) rguedes@ufpe.br and (2) guedes.rca@gmail.com

ABSTRACT

Cortical spreading depression (CSD) is characterized by reversible reduction of spontaneous and evoked electrical activity of the cerebral cortex. Experimental evidence suggests that CSD may modulate neural excitability and synaptic activity, with possible implications for long-term potentiation. Systemic factors like anesthetics and insulin-induced hypoglycemia can influence CSD propagation. In this study, we examined whether the post-CSD ECoG potentiation can be modulated by anesthetics and insulin-induced hypoglycemia. We found that awake adult rats displayed increased ECoG potentiation after CSD, as compared with rats under urethane+chloralose anesthesia or tribromoethanol anesthesia. In anesthetized rats, insulin-induced hypoglycemia did not modulate ECoG potentiation. Comparison of two cortical recording regions in awake rats revealed a similarly significant ($p < 0.05$) potentiation effect in both regions, whereas in the anesthetized groups the potentiation was significant only in the recording region nearer to the stimulating point. Our data suggest that urethane+chloralose and tribromoethanol anesthesia modulate the post-CSD potentiation of spontaneous electrical activity in the adult rat cortex, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect. Data may help to gain a better understanding of excitability-dependent mechanisms underlying CSD-related neurological diseases.

Key words: Urethane; Chloralose; Tribromoethanol; LTP; Spreading depression;

Hypoglycemia

1. Introduction

Cortical spreading depression (CSD) is a brain phenomenon characterized by marked depression of spontaneous and evoked electrical activity of the cerebral cortex in response to electrical, chemical, or mechanical stimulation of a point in the tissue [1]. Clinically, CSD is related to important human neurological diseases, such as epilepsy, migraine, and cerebral ischemia [2,3].

CSD has been studied mostly in anesthetized animal models. The use of anesthetics is essential in the prevention and relief of pain associated with surgical procedures. However, anesthetics continuously depress the central nervous system (CNS) and change the electroencephalogram (EEG) pattern compared to the pattern in awake animals. Thus, anesthetics not only play an important role in the generation of scientific data but also influence the interpretation of such data, introducing an additional variable to the study of brain function. Distinct anesthetics can differentially modulate CSD propagation and the amplitude and duration of its DC-shift [4-6], as can factors like insulin-induced hypoglycemia [7,8]. During CSD, glucose utilization increases in brain tissue, leading to a rapid and substantial reduction in tissue glucose levels [9].

Although spontaneous cortical activity is depressed, abnormal epileptiform EEG waves can appear during CSD [1], suggesting that CSD may modulate neural excitability and synaptic activity. This may have implications for long-term potentiation (LTP), as evidenced in rats *in vitro* [10] and *in vivo* [11], as well as in human brain tissue *in vitro* [12].

More recently, our group demonstrated in anesthetized rats the potentiation of evoked and spontaneous electrical cortical activity (ECoG) after CSD [13]. The present study extends our prior observations of ECoG potentiation effects that result from the CSD passing through the cortex [13]. Specifically, we compare the ECoG features in awake rats and in rats

subjected to two types of anesthetic agents: a mixture of urethane plus chloralose, and tribromoethanol. In addition, since insulin-induced hypoglycemia during CSD recording can influence CSD propagation [7,8], we analyzed post-CSD ECoG potentiation in anesthetized rats after insulin-induced hypoglycemia. We hypothesized that first, the post-CSD ECoG potentiation is reduced in rats under anesthesia as compared with awake animals, and second, that this anesthetic effect could be modulated by insulin-induced hypoglycemia.

1. Methods

The 52 male Wistar rats used in this study (90–120 days old) were handled in accordance with the norms of the institutional Ethics Committee for Animal Research at our university (approval protocol number 23076.021545/2011-32). Rats were housed in a room maintained at $22\pm1^{\circ}\text{C}$ under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). They had free access to water and a commercial lab chow diet with 23% protein.

The electrocorticogram was recorded for at least 4 uninterrupted hours under anesthesia with 1g/kg urethane plus 40 mg/kg alpha-chloralose (U+C groups) or 250 mg/kg tribromoethanol (TBE groups), or in awake animals that had the recording electrodes implanted 1-2 days before (awake groups). For the U+C, TBE and awake condition, we compared one group that was subjected to CSD during the electrophysiological recording session with a corresponding group in which ECoG was recorded without eliciting CSD (no-CSD condition). A seventh group (in the U+C condition) was subjected to hypoglycemia in the post-CSD period by intraperitoneally injecting insulin lispro (Humalog®; 3.0–4.0 U/kg in 0.2–0.4 ml Ringer's solution). The insulin dose was chosen based on previous reports [8]. Insulin administration took place in the post-CSD period. The insulin group was compared with the U+C group that was not injected with insulin. The eventual reduction of the

anesthetic level was monitored frequently by changes in ECoG synchronization and by the appearance of motor responses to moderate painful stimuli applied to one hind paw. When necessary, additional anesthetic was injected (one-third or one-half of the initial dose for urethane+chloralose and tribromoethanol, respectively).

The animals had their skulls exposed through a midline incision in the scalp. A rectangle of the right parietal bone (4×2 mm) was removed with the aid of a drill and replaced with a transparent acrylic rectangle with two holes where the Ag-AgCl agar-Ringer-type recording electrodes were fixed. This transparent plate enabled the positioning of the electrodes under direct visualization in order to optimize contact between the electrode tip and the intact dura mater. A circular portion of the frontal cortex (2–3-mm diameter) was exposed by drilling a hole on the frontal bone. Over the course of 30 min, this opening was used to apply a cotton ball soaked with 4% KCl to elicit several episodes of CSD.

For the recordings in the awake condition, the surgical procedure described above was performed, under tribromoethanol anesthesia, 24–48 h before the recording, and the transparent plate was fixed onto the skull with the aid of dental acrylic. A stainless steel screw (1 mm diameter) was fixed to the skull of the animal to allow better fixation of the plate with the electrodes in the recording position. A plastic ring (5-mm height and 4-mm diameter) was placed around the stimulation hole and fixed to the skull with dental acrylic. This plastic ring was filled with mineral oil and sealed with bone wax or cotton. After the implantation procedure, the animals received 5 ml of a physiological saline solution containing 0.25 g glucose followed by an intramuscular injection of 30,000 U (0.2 ml) of benzatine benzylpenicillin. The rats were kept for an additional 30 minutes in the stereotactic apparatus for stabilization of the electrode fixation. They were thereafter housed individually in polypropylene cages to let them recover from surgery. Recovery took 1–2 days and was

characterized by the animals return to normal behavior, including resuming a normal feeding pattern.

During the recording period, rectal temperature was maintained at $37\pm1^{\circ}\text{C}$ using a heating pad. Both the spontaneous electrical cortical activity (detected by ECoG) and the DC potential of the cortical surface were recorded at two points of the right parietal surface. A common reference electrode was placed on the contralateral hemisphere. Recording electrodes were aligned in the frontal-occipital direction and were parallel to the midline. The two cortical points from which the electrical activity was recorded were 5 mm and 8 mm posterior to the stimulating point, and were designated as the near (*n*) and remote (*r*) recording points, respectively. The electrodes were connected to a digital recording system (Biopac MP100, USA). Recordings were digitized and stored in a computer. For each recording hour, representative samples of approximately 10 minutes of recording were analyzed off-line with the support of an algorithm implemented in Matlab TM software, version R2011B. This algorithm calculates the average amplitude of the ECoG waves.

The first two hours of recording passed without cortical stimulation with KCl, i.e., no CSD was elicited, and was termed the *baseline period*. At the beginning of the third recording hour, KCl was applied to the frontal hole on the intact *dura mater* for 30 min. After this period, the cotton ball soaked with 4% KCl was removed and the recording continued for more two hours (termed the *post-CSD period*). ECoG amplitudes before and after CSD were compared as the basis for assessing both the potentiation of spontaneous electrical activity and the effects of the anesthetic agents on this potentiation.

At the end of the recording session, the still-anesthetized animals were subjected to euthanasia [13]. The brains of some animals were preserved in 70% alcohol, embedded in paraffin, and longitudinally sectioned (50- μm thickness). The sections were stained with

hematoxylin-eosin and analyzed to detect possible damage caused by the implanted epidural electrodes.

The amplitude values of the 10-min digitized ECoG samples were averaged and normalized relative to the lowest value, which was considered to be equal to 1 [13]. The normalized values were reported as relative units. Data from the periods before and after CSD from the same animal were compared using the Student's paired t-test. Intergroup differences were compared using one-way analysis of variance (ANOVA on ranks) followed by a post-hoc test as indicated. Differences were considered significant for $p < 0.05$. Data were presented as mean $\pm$ SEM (relative units).

2. Results

3.1 ECoG amplitude is potentiated after CSD

Application of KCl for 30 minutes at a single point in the frontal cortex elicited the following average number of CSD episodes: 4.5 ± 0.7 (range: 4-7) in the urethane+chloralose group, 6.2 ± 0.9 (range: 5-7) in the tribromoethanol group, 5.3 ± 0.7 (range: 3-7) in the awake group, and 7.8 ± 1.6 (range: 4-9) in the insulin-induced hypoglycemia group. No intergroup significant difference was observed.

Figure 1-A1 shows representative ECoG recordings from the awake group, from the tribromoethanol group, and from the urethane+chloralose group. Compared with the 2-hour baseline period (left column), the ECoGs in the post-CSD period had higher amplitudes (final 2 hours of the recording; right column).

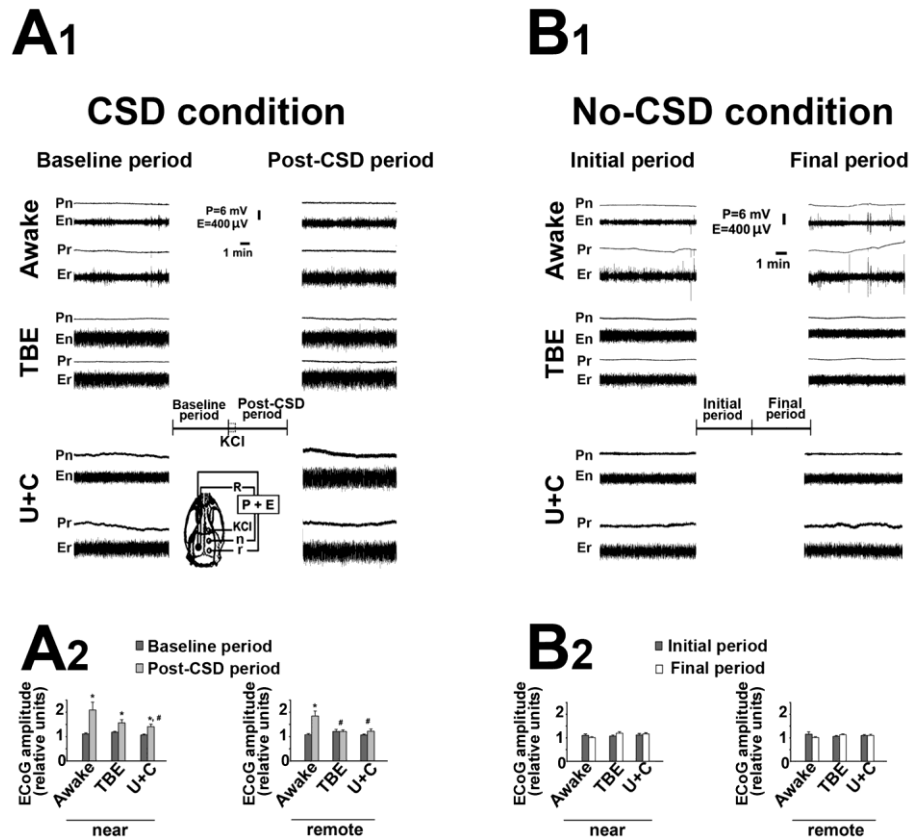


Fig. 1-A1 and B1- DC potential recordings (P) and electrocorticograms (E) on the right hemispheres of six 90–120-day-old rats: three of them under CSD (CSD condition), and the other three were CSD-free (no-CSD condition). The diagram of the skull shows the near (n) and remote (r) recording positions (in relation to the stimulating point) from which the traces marked at the left with the same letters were obtained. The position of the common reference electrode (R) on the left part of the skull and the KCl application point are also shown. The time diagram indicates the baseline period (120 min), the CSD period (30 min; dotted square) and the post-CSD period (120 min). In the no-CSD condition, the periods were termed initial and final periods. In the CSD condition, there was an increase in the ECoG amplitude in the post-CSD period compared with the baseline ECoG. In the no-CSD condition, no amplitude increase was observed. In the post-CSD period, the excerpted traces were taken at 30–60 min after finishing KCl stimulation. A2- ECoG amplitudes of the awake (n=10), tribromoethanol (TBE, n=7), and urethane plus chloralose (U+C, n=13) groups of rats in the CSD condition. Data are presented as mean $\pm$ SEM in relative units. The asterisk indicates an intragroup difference (baseline period versus post-CSD period; $p<0.05$; paired t-test). The symbol # indicates an intergroup difference in comparison with the awake group ($p<0.05$; ANOVA on ranks followed by a post-hoc Dunn's test). B2- ECoG amplitudes of the awake and anesthetized control animals in which CSD was not elicited (no-CSD condition; awake, n=6; U+C, n=5; TBE, n=6). There were no statistically significant differences between the values of the initial (dark bars) and final (white bars) periods in any of the groups.

The quantification of this post-CSD potentiation effect is shown in the panel A2 of Figure 1. Intragroup comparison (baseline period versus post-CSD period) at the near

recording point revealed a significant potentiation effect in all three groups. Specifically, there were amplitude increases of 88%, 32%, and 32% in the awake, tribromoethanol, and urethane+chloralose groups respectively ($p < 0.03$; paired t-test). At the remote recording point, there was significant potentiation only in the awake condition (amplitude increase of 71%). Intergroup comparison confirmed that the potentiation effect was greater in the awake condition ($p < 0.02$; Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks plus Dunn's test).

In the two awake groups that received implanted epidural electrodes, macroscopic examination of the cortical surface revealed that most animals showed some degree of pressure on the dura mater at the sites where the electrode tips were placed, but there were no signs of lesions. Histological examination of these regions indicated only punctiform alteration in a few cases that was restricted to the upper cortical layers. This did not seem to interfere with quantification of the ECoG potentiation effect since the recordings showed the same technical quality as previous acute recordings that were performed with non-implanted electrodes [13].

The experiments shown in panels B1 and B2 of Figure 1 indicate that the ECoG activity is actually potentiated by CSD rather than being due to the duration of the ECoG recording. Under the no-CSD condition, no amplitude difference in the ECoG was observed.

3.2 The effect of the anesthetic agents on ECoG potentiation is not modulated by hypoglycemia

The effect of insulin-induced hypoglycemia on the ECoG potentiation was investigated in 5 rats anesthetized with urethane+chloralose. Two hours after insulin injection, blood glucose levels decreased from the basal value of 98.8 ± 13.2 mg/dl to 56.8 ± 5.4 mg/dl ($p < 0.005$; paired t-test). As seen in the ECoG traces in Figure 2, the post-CSD ECoG

amplitude was higher than in the baseline period in these animals. Quantification of this effect showed significant (44%) post-CSD ECoG potentiation at the near but not the remote recording point. This was similar to the 32% potentiation observed in the control group in which rats were not injected with insulin.

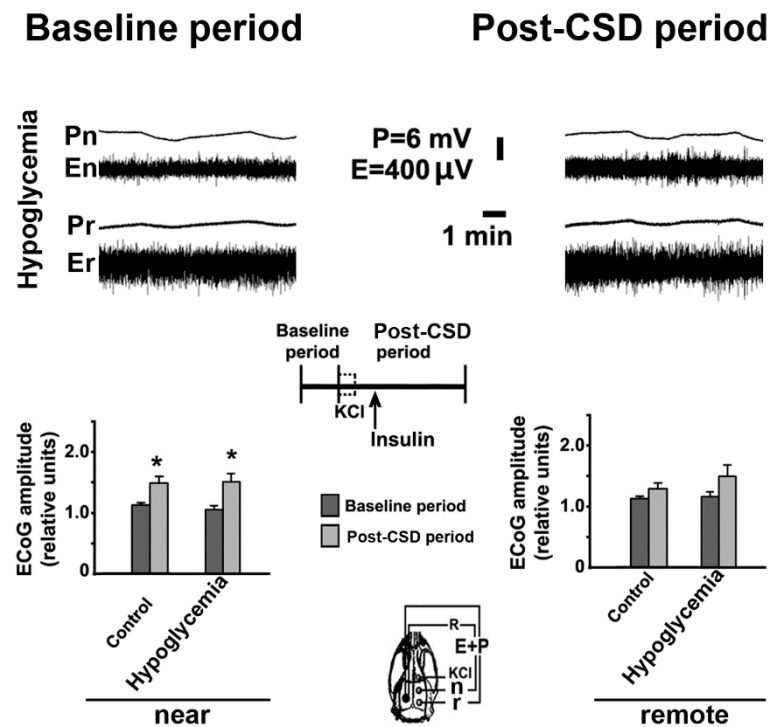


Fig. 2. The upper panels show DC potential (P) and electrocorticogram (E) recordings on the right hemispheres of one 90–120-day-old rat. No CSD was elicited in the baseline period (first hour of the recording; left column). The post-CSD period (right column) began after KCl application for 30 min and was followed one hour later by the i.p. injection of insulin (see the time diagram). The traces shown on the right were taken 148 min after starting the KCl application. The description of the diagram of the skull is the same as in Figure 1. In this condition there was an increase in the ECoG amplitude at the near recording area in the post-CSD period as compared with the baseline ECoG for the same animal. The lower panels show the quantification of this effect. The asterisks indicate significant ($p < 0.05$; paired t-test) post-CSD increases in the amplitude of the cortical spontaneous activity compared with the pre-CSD values.

3. Discussion

Our data confirmed the potentiation of ECoG amplitudes after CSD. This phenomenon was reported previously by our group [13] and is supported by *in vitro* and *in vivo* studies by others [10,11]. There are two main findings from the present study: first, post-CSD ECoG potentiation is modulated by anesthetic agents, and second this effect of the anesthetic agents is not appreciably influenced by insulin-induced hypoglycemia. The data unequivocally demonstrated significantly higher potentiation of the ECoG amplitude after CSD in awake animals as compared with anesthetized animals. The two types of anesthetic agents that we used are good representatives of long-acting and short acting anesthetics, respectively, that are widely used in neurophysiological experiments, including in CSD studies [13-16]. Unlike other anesthetics, such as ketamine [17], the combination of urethane+alpha-chloralose does not block CSD [4]. Tribromoethanol is a short-lasting anesthetic that is very safe in rodents and that is appropriate for experiments that require anesthesia for short periods [16]. In our 4-hour recordings, we had to supplement the tribromoethanol group with additional administration of anesthetic. Despite this supplementation, the ECoG potentiation in this group did not differ from that in the urethane+chloralose group, suggesting that the underlying mechanisms of this CSD-dependent potentiation effect are influenced by both anesthetics in the same manner. Our data also demonstrate that the CSD-free group did not show ECoG potentiation. Therefore, we conclude that this potentiation is a real synaptic change induced by CSD, as suggested previously [13,18].

Although there are several physiological processes that could explain the potentiation data, we think that two types of mechanisms deserve special attention, namely mechanisms that involve the activation of glutamatergic synapses [5] and disinhibition mechanisms that act on inhibitory synapses [19]. These mechanisms are not necessarily mutually exclusive; rather, they could act independently, but this requires further investigation. Because CSD has

been associated with increased brain excitability, it is important to emphasize that activation of NMDA receptors might elicit CSD [20]. The action of anesthetic agents could reduce neuronal activity and thus attenuate the post-CSD potentiation of ECoG as compared with animals in the awake condition (Fig. 1). Because neuron-glia communication is involved in CSD [20], and taking into account that this communication may be affected by anesthetics [6], it is reasonable to speculate that CSD-dependent processes such as ECoG potentiation might be reduced during anesthesia. In fact, distinct anesthetics can modulate CSD propagation [4] as well as other CSD features such as the duration, amplitude, and the frequency of evoked CSDs [6,15]. Interestingly, both alpha-chloralose [21] and urethane [22] can enhance GABA_A receptor activity. Tribromoethanol is reported to increase the inhibitory effects of 5-HT [23] and can reduce auditory responses in mice [16]. Further investigation is needed to clarify the relationship between CSD and LTP, as well as to understand how these phenomena are affected by anesthetics.

The clinical relevance of post-CSD potentiation merits further discussion. First, CSD occurs in all animal species tested so far, including humans [12]. Second, in vivo experiments in mammals [13,18] have documented potentiation of the brain's electrical activity after CSD. In addition, in vitro observations confirm the existence of this potentiation in human brain tissue [12]. It is tempting to postulate that post-CSD ECoG potentiation might be involved in the physiopathological mechanisms underlying human neurologic disorders, such as ischemia, migraine, and traumatic brain injury [20,24,25]. On the other hand, CSD preconditioning may have a protective role in the brain [26]. However, currently we are unable to explain the mechanisms underlying such involvement.

The discovery of insulin receptors in the brain [27] sparked an interest in investigating the possible involvement of insulin in certain human neural processes. A causal relationship has been reported between insufficient insulin action in the brain and important neurological

disturbances, such as those involved in cognition, learning and memory, neuroinflammation, and Alzheimer's disease [28]. Our findings demonstrated that insulin-induced hypoglycemia failed to modulate the effects of the anesthetic agents on the post-CSD ECoG potentiation. Since insulin was injected intraperitoneally, it is difficult to discuss on a direct effect of insulin on cerebral receptors [29]. Other experiments with injection of insulin in the cerebral cortex or in the cerebral ventricle are necessary to confirm this hypothesis. The reduction we observed in blood glucose levels after insulin injection confirmed the effectiveness of the insulin in inducing hypoglycemia; in addition, it demonstrated that ECoG potentiation after CSD has not been influenced by decreasing glucose availability. Interestingly, memory in Alzheimer's patients is reported to be enhanced by insulin but not by glucose [30].

In the awake groups, we observed ECoG potentiation at both the near and the remote recording sites (located respectively at 5mm and 8mm posterior to the KCl application point), whereas in the anesthetized rats we observed this phenomenon only at the recording point near the stimulating region. This suggests a regional difference in the modulatory effect of the anesthetic agents. Notably, distinct brain regions can react differently to pharmacological challenges in terms of CSD [31], and regional differences in LTP in the visual cortex were reported recently in urethane-anesthetized rats [32].

In conclusion, these *in vivo* data support the existence of ECoG potentiation in the adult rat cortex after CSD and allow us to draw the following four conclusions. First, comparison of anesthetized versus awake animals indicated that post-CSD potentiation was modulated by the anesthetic agents. Second, the comparison between long-lasting and short-lasting anesthetic agents indicated that both had similar modulating effect on potentiation. Third, insulin-induced hypoglycemia failed to modulate the action of the anesthetic agents on the ECoG potentiation, suggesting that this action does not depend on the effects of acute lowering glucose levels on the brain. Fourth, comparison between two cortical recording sites

suggested a regional difference in potentiation in anesthetized versus awake animals. Further investigation is needed to determine how these findings can be exploited to gain a better understanding of excitability-dependent neurological diseases.

Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- No. 140703/2011-0), 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

- [1] A.A.P. Leão, Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J. Neurophysiol.* 7 (1944) 359-390.
- [2] A. Gorji, Spreading depression: a review of the clinical relevance, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38 (2001) 33-60.
- [3] M. Seghatoleslam, M.K. Ghadiri, N. Ghaffarian, E.-J. Speckmann, A. Gorji, Cortical spreading depression modulates the caudate nucleus activity, *Neuroscience* 267 (2014) 83-90.
- [4] R.C.A. Guedes, J.M. Barreto, Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25 (1992) 393-397.
- [5] C. Kudo, M. Toyama, A. Boku, H. Hanamoto, Y. Morimoto, M. Sugimura, H. Niwa, Anesthetic effects on susceptibility to cortical spreading depression, *Neuropharmacol.* 67 (2013) 32-36.
- [6] R. Saito, R. Graf, K. Hubel, J. Taguchi, G. Rosner, T. Fujita, W. Heiss, Halothane, but not alpha-chloralose, blocks potassium-evoked cortical spreading depression in cats, *Brain Res.* 699 (1995) 109–115.
- [7] U. Hoffmann, I. Sukhotinsky, K. Eikermann-haerter, C. Ayata, Glucose modulation of spreading depression susceptibility, *J. Cerebr. Blood Flow Met.* 33 (2013) 191-195.
- [8] A. Ximenes-da-Silva, R.C.A. Guedes, Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24 (1991) 1277-1281.
- [9] M. Shinohara, B. Dollinger, G. Brown, S. Rapoport, L. Sokoloff, Cerebral glucose utilization: local changes during and after recovery from spreading cortical depression, *Science* 203 (1979) 188–190.

- [10] D. R. Footitt, N.R. Newberry, Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro, *Brain Res.* (1998) 339-342.
- [11] A. Gorji, P.K. Zahn, E. M. Pogatzki, E.J. Speckmann, Spinal and cortical spreading depression enhance spinal cord activity, *Neurobiol. Dis.* 15 (2004) 70-79.
- [12] A. Gorji, E. Speckmann, Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues, *Europ. J. Neurosci.* 19 (2004) 3371-3374.
- [13] T.K.M. Souza, M.B. Silva, A.R. Gomes, H.M. Oliveira, R.B. Moraes, C.T. Freitas Barbosa, R.C.A. Guedes, Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats, *Exp. Brain Res.* 214 (2011) 463-469.
- [14] R. Choudhuri, L. Cui, C.Yong, Cortical spreading depression and gene regulation: Relevance to migraine, *Ann. Neurol.* 51(2002) 499-306.
- [15] C. Kudo, A. Nozari, M. A. Moskowitz, C. Ayata, The impact of anesthetics and hyperoxia on cortical spreading depression, *Exp. Neurol.* 212 (2008) 201-206.
- [16] J. K. Maheras, A. Gow, Increased anesthesia time using 2,2,2-tribromoethanol–chloral hydrate with low impact on mouse psychoacoustics, *J. Neurosci. Meth.* 219 (2013) 61–69.
- [17] N. A. Gorelova, V.I. Koroleva, T. Amemori, V. Pavlik, J. Bures, Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 66 (1987) 440-447.
- [18] U. Faraguna, A. Nelson, V.V. Vyazovskiy, C. Cirelli, G. Tononi, Unilateral cortical spreading depression affects sleep need and induces molecular and electrophysiological signs of synaptic potentiation in vivo, *Cereb. Cortex* 20 (2010) 2939-2947.
- [19] L.L. McMahon, J. A. Kauer, Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity, *Neuron* 18 (1997) 295-305.

- [20] G.G. Somjen, P.G. Aitken, G.L. Czeh, O. Herrera, J. Jing, J.N. Young, Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70 (1992) Suppl.S248-254.
- [21] K. M. Garrett, J. Gan, Enhancement of γ -aminobutyric acidA receptor activity by α -chloralose, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285 (1998) 680-686.
- [22] K. Hara, R.A. Harris, The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels, *Anesth. Analg.* 94 (2002) 313–318.
- [23] P.B. Bradley, A. Dray, Modification of the responses of brain stem neurones to transmitter substances by anaesthetic agents, *Br. J. Pharmac.* 48 (1973) 212-224.
- [24] J. Dreier, The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease, *Nat. Med.* 17 (2011) 439-447.
- [25] T. Torrente, R. Cabezas, M.F. Avila, L.M. García-Segura, G.E. Barreto, R.C.A. Guedes, Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes?, *Neurosci. Lett.* 565 (2014) 2-6.
- [26] E. Viggiano, D. Viggiano, A. Viggiano, B. De Luca, M. Monda, Cortical Spreading Depression Increases the Phosphorylation of AMP-Activated Protein Kinase in the Cerebral Cortex, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 2431–2439.
- [27] J. Havrankova, D.E Schmechel, J. Roth, M. Brownstein, Identification of insulin in the rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75 (1978) 5737–5741.
- [28] K.T. Dineley, J.B. Jahrling, L. Denner, Insulin resistance in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Dis.* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.001>
- [29] W. Zhao, X. Wu, H. Xie, Y. Ke, W.-H. Yung, Permissive role of insulin in the expression of long-term potentiation in the hippocampus of immature rats, *Neurosignals* 18 (2010) 236–245.

- [30] S. Craft, S. Asthana, J.W. Newcomer, C.W. Wilkinson, I.T. Matos, L.D. Baker, M. Cherrier, C. Lofgreen, S. Latendresse, A. Petrova, S. Plymate, M. Raskind, K. Grimwood, R.C. Veith, Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose, *Arch. Gen. Psychiatry* 56 (1999) 1135-1140.
- [31] V.B. Bogdanov, S. Multon, V. Chauvel, O.V. Bogdanova, D. Prodanov, M.Y. Makarchuk, J. Schoenen, Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat, *Neurobiol. Dis.* 41(2011) 430-435.
- [32] M.-C. Kuo, H.C. Dringenberg, Comparison of long-term potentiation (LTP) in the medial (monocular) and lateral (binocular) rat primary visual cortex, *Brain Res.* 1488 (2012) 51-59.

8.2 Artigo 2

Title: Interaction between unfavorable lactation and anesthetic agents on the potentiation of electrocorticogram after spreading depression in adult rats



Authors: Thays Kallyne Marinho de **Souza**¹, Mariana Barros e **Silva-Gondim**¹, Marcelo Cairrão Araújo **Rodrigues**², Rubem Carlos Araújo **Guedes**^{1CA}.

Affiliation: ¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco,
BR-50670901, Recife - Pernambuco, Brazil.

²Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco,
BR-50670901, Recife - Pernambuco, Brazil.

^{CA} (Corresponding author): Prof. Rubem C.A. Guedes; Dept. of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, BR-50670901, Recife Pernambuco, Brazil.

Phone: +55- 81-21268936; **FAX:** +55-81-21268473

E-mails: (1) rguedes@ufpe.br and (2) guedes.rca@gmail.com

ABSTRACT

Aims: Cortical spreading depression (CSD) can be affected by unfavorable conditions of lactation and by anesthetic agents. We have previously reported in anesthetized rats that after CSD the electrocorticogram (ECoG) amplitude is increased (ECoG potentiation). Here, we investigated this potentiation in adult rats previously suckled in different lactation conditions. We compared awaked and anesthetized rats.

Main methods: Rats were suckled in litters with 12 pups (L12 condition), which is considered unfavorable. At adulthood, in tribromoethanol- and urethane+chloralose-anesthetized, and awake animals, we evaluated the increase in the ECoG amplitude after CSD at two cortical points (one point near, and another remote to the CSD-eliciting site). The amplitude of the ECoG waves was averaged with the support of an algorithm implemented in Matlab TM software. We also measured the body and brain weights.

Key findings: L12 rats presented significantly lower body- and brain weights than control rats ($p<0.01$). Compared with the baseline (before CSD) amplitude, in the near cortical recording point we found a significant ($p<0.01$) ECoG potentiation after CSD (43%, 61% and 49% for the awake, and tribromoethanol and urethane+chloralose anesthesia, respectively). For the remote point, the percent increases were respectively 46%, 43% and 19%. No significant difference was observed between awake and anesthetized animals.

Significance: The results suggest an interaction between unfavorable lactation condition and anesthetic agents on the electrocorticogram potentiation after CSD in rats, with potential implications for the human health that remain to be investigated.

Key words: Unfavorable lactation; Anesthetic agents; Spreading depression; ECoG potentiation; Rats

Introduction

Unfavorable lactation conditions can be created in the rat by increasing the number of pups to be suckled by one dam (Morgane et al., 1978; Rocha-de-Melo et al., 2006). This condition of increased demand for the dam's milk can lead to a moderate degree of malnutrition, which at this early stage of mammal development has appreciable impact on the brain electrical activity (Morgane et al., 1978). Our group has studied the relationship between nutritional alterations and brain electrophysiological properties analyzing changes in the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD; see Guedes, 2011 for a review).

CSD is a fully reversible phenomenon characterized by marked depression of spontaneous and evoked electrical activity of the cerebral cortex in response to electrical, chemical, or mechanical stimulation of a point in the tissue. From the stimulated point, CSD spreads concentrically to remote cortical regions (Leão., 1944, Gorji., 2001). Clinically, CSD is related to important human neurological diseases, such as epilepsy, migraine, and cerebral ischemia (Gorji., 2001; Lauritzen et al., 2011; Seghatoleslam et al., 2014). During CSD, abnormal epileptiform EEG waves appear (Leão., 1944), showing that CSD may modulate neural excitability mechanisms and synaptic activity. This suggests a relationship between CSD and long-term potentiation (LTP) as previously demonstrated in animals and human brain tissue (Footitt and Newberry, 1998; Gorji and Speckmann, 2004).

Most of the experimental studies on CSD are usually conducted in anesthetized animals. Anesthetic agents are essential in the prevention of pain associated with surgical procedures that are required for electrocorticogram (ECoG) recording. However, anesthetics can change the ECoG pattern compared to the pattern in awake organisms. Thus, while anesthetics are important in the generation of scientific data, they also influence the interpretation of such

data. This represents an additional variable that has to be considered in the study of brain function (Saito et al., 1995; Reid et al., 1999).

Our group previously demonstrated that the amplitude of the ECoG waves increased after CSD had passed through the cerebral cortex of anesthetized rats, when compared with the pre-CSD pattern in the same animal (Souza et al., 2011). The present study extends our prior observations by analyzing specifically the CSD-related ECoG potentiation in awake and anesthetized rats that had been suckled under unfavorable lactation conditions. Our hypothesis is that unfavorable lactation condition (represented by suckling the pups in litters with 12 newborns) influences the potentiation effect associated with CSD.

Material and methods

Animals and nutritional condition

Newborn rats were suckled in litters formed by 12 pups (L12 condition). This number of pups per litter has proven to be effective in triggering a moderate degree of malnutrition during the lactation period, as indicated by reduction in body and brain weights (Rocha-de-Melo et al., 2006; Souza et al., 2011). All dams had free access to water and a commercial lab chow diet with 23% protein. The pups were weighed on postnatal days 30, 60 and 90.

Experiments were performed when the pups reached 90-120 days of life. We carried the experiments in accordance with the norms of the institutional Ethics Committee for Animal Research at our university. These norms comply with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA). The 34 male Wistar rats used in this study were housed in polypropylene cages (51 cm×35.5 cm×18.5 cm) in a room maintained at 22±1°C under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The animals were distributed into three groups according to the anesthesia conditions: one group (n=11 rats) was recorded

under intraperitoneal anesthesia with 1g/kg urethane plus 40 mg/kg alpha-chloralose (U+C groups); a second group (n=13 rats) was recorded under anesthesia with 250 mg/kg tribromoethanol (TBE group); the third group (n=10 rats) had the recording electrodes implanted first, and were recorded at least after 1–2 days of recovery in the awake state. The anesthetics were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Electrophysiological recordings

The recordings of the cortical electrical activity were performed for at least 4 uninterrupted hours. In the two anesthetized groups, the recordings were conducted under the action of the respective anesthetic agents (urethane+chloralose or tribromoethanol). In the third group, recordings were performed with the animals in the awake state 24–48 h after the implantation of the recording electrodes, as described below.

The eventual reduction of the anesthetic level was monitored frequently by changes in ECoG synchronization and by the appearance of motor responses to moderate painful stimuli applied to one hind paw. When necessary, additional anesthetic was injected (one-third or one-half of the initial dose for urethane+chloralose and tribromoethanol, respectively). Anesthetic supplementation was required more frequently in the tribromoethanol group than in the urethane+chloralose animals. The anesthetized rats had their heads secured by a stereotaxic frame, and had their skulls exposed through a midline incision in the scalp. Pressure points in the head received a gel containing 2% xylocaine. A rectangle of the right parietal bone (4×2 mm) was removed with the aid of a drill and replaced with a transparent acrylic rectangle, in which we drilled two holes where two Ag-AgCl agar-Ringer-type recording electrodes were fixed. The electrodes consisted of 2-cm plastic pipettes with a 0.5-mm internal diameter at the tip and 2-mm inner diameter at the superior opening. The

electrodes were filled with Ringer's solution solidified with the addition of 1% agar. The transparent plate enabled the positioning of the electrodes under direct visualization in order to optimize contact between the electrode tip and the intact dura mater. A circular portion of the frontal cortex (2–3-mm diameter) was exposed by drilling a hole on the frontal bone. Over the course of 30 min, this opening enabled the application of a cotton ball soaked with 4% KCl (approximately 540 mM) to elicit several episodes of CSD.

In the group in which the recordings were performed without anesthesia, the surgical procedure described above was performed, under tribromoethanol anesthesia, 24–48 h before the recording, and the acrylic plate was fixed onto the skull with the aid of dental acrylic. A stainless steel screw (1 mm diameter) was fixed to the skull of the animal to allow better fixation of the plate with the electrodes in the recording position. A plastic ring (5-mm height and 4-mm diameter) was placed around the stimulation hole and fixed to the skull with dental acrylic. At the end of the surgical procedure, we filled the plastic ring attached to the frontal hole with mineral oil, and sealed it with bone wax or cotton. After the implantation procedure, the animals received 5 ml of a physiological saline solution containing 0.25 g glucose followed by an intramuscular injection of 30.000 U (0.2 ml) of benzatine benzyl-penicillin (Benzetacil®, Eurofarma Labs). The rats were kept for an additional 30 minutes in the stereotactic apparatus for stabilization of the electrode fixation. They were thereafter housed individually in polypropylene cages to let them recover from surgery. Recovery took at least 1–2 days and was characterized by the animals return to normal behavior, including resuming a normal feeding pattern.

During the recording period, rectal temperature was maintained at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ using a heating pad. Both the spontaneous electrical cortical activity (detected by ECoG) and the DC potential of the cortical surface were recorded at two points of the right parietal surface using two Ag-AgCl agar-Ringer type electrodes as previously reported (Souza et al., 2011).

Recordings were performed using a common reference electrode of the same type placed on the contralateral hemisphere. Recording electrodes were aligned in the frontal-occipital direction and were parallel to the midline. The two cortical points from which the electrical activity was recorded were designated as the near (*n*) and remote (*r*) recording points, respectively.

On the day of the electrophysiological recording, the electrodes were connected to a digital recording system (Biopac MP100, USA). The ECoG and the DC potential of the cortex were recorded continuously for at least 4 h. Recordings were digitized and stored in a computer. For each recording hour, representative samples of approximately 10 minutes of recording had the average amplitude of the ECoG waves calculated with the support of an algorithm implemented in Matlab™ software, version R2011B. The averaged amplitudes of the ECoG were normalized relative to the lowest value, which was considered to be equal to 1. The normalized values were reported as relative units.

The first two hours of recording passed without cortical stimulation with KCl, i.e., no CSD was elicited; this initial 2-h recording was termed the *baseline period*. At the beginning of the third recording hour, KCl was applied to the frontal hole for 30 min. After this period, the KCl was removed and the recording continued for more two hours (termed the *post- CSD period*). ECoG amplitudes before and after CSD were compared as the basis for assessing both the potentiation of spontaneous electrical activity and the effects of the anesthetic agents on this potentiation.

The brains of some animals were preserved in 70% alcohol, embedded in paraffin, and longitudinally sectioned (50-μm thickness). The sections were stained with hematoxylin-eosin and analyzed to detect possible damage caused by the implanted epidural electrodes. Other animals had their brains removed and weighed (wet-brain weight), and thereafter kept in a

stove at 100°C and weighed each other day, until it reached a constant weight (dry-brain weight).

Statistical analysis

Data from the periods before and after CSD in the same animal were compared using the Student's paired t-test. Differences in the body and brain weight were compared by unpaired t-test. Amplitude increases in the spontaneous cortical activity were compared using one-way analysis of variance (ANOVA on ranks) followed by a post-hoc test (Mann-Whitney) as indicated. Differences were considered significant for $p < 0.05$. Data were presented as mean $\pm$ S.E.M. (relative units).

Results

Body and brain weight

As illustrated in Fig.1 the L12 groups presented body and brain weights significantly lower ($p < 0.01$) than those of age-matched control rats from our previous studies that were suckled in litters with six pups (Souza et al., 2011; Rocha-de-Melo et al., 2006), indicating that the L12 condition was effective in inducing some degree of early malnutrition. In the L6 condition, the body weight (mean $\pm$ standard deviation in g) at postnatal day 30, 60 and 90 were respectively 94.9 $\pm$ 10.3, 285.8 $\pm$ 25.6, and 363.1 $\pm$ 31.2. In the L12 condition, the corresponding values were 80.7 $\pm$ 12.3, 212.4 $\pm$ 22.8, and 273.1 $\pm$ 29.3. The wet and dry brain weights were respectively, 1.91 $\pm$ 0.07 and 0.54 $\pm$ 0.02 for the L6 condition, and 1.79 $\pm$ 0.08, 0.50 $\pm$ 0.03 for the L12 condition.

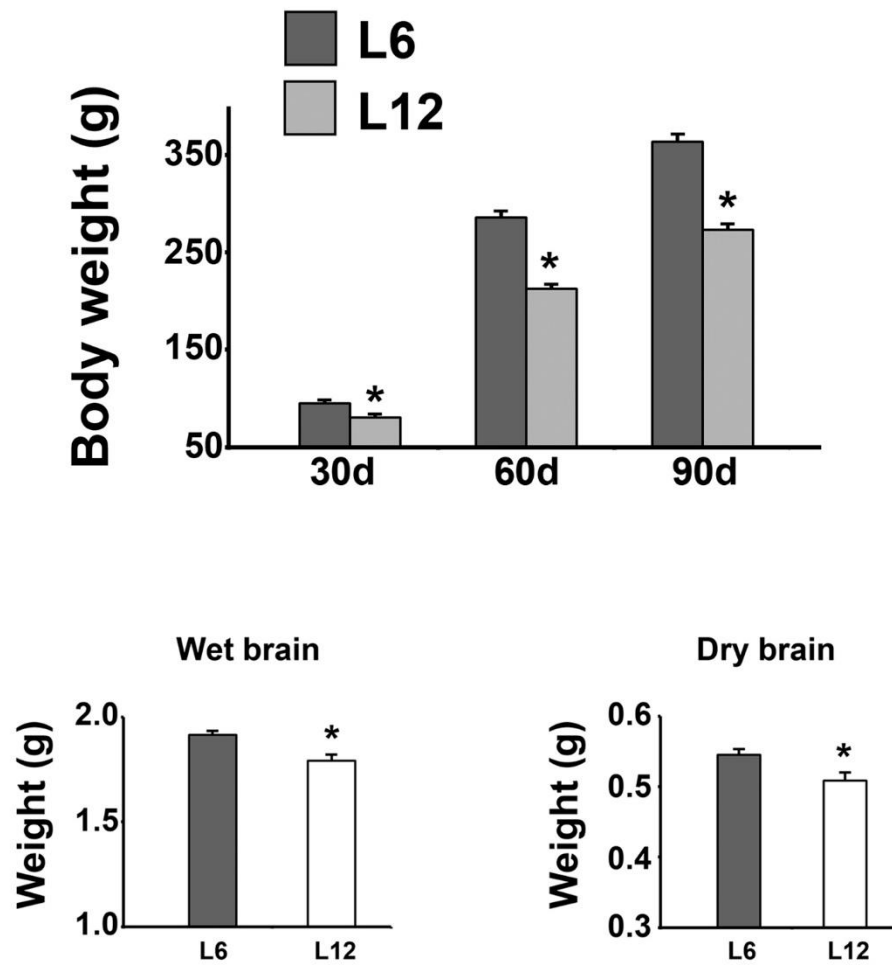


Fig. 1. Body weight of rats at 30- 60- and 90 days of age (upper panel), and brain weights at 90-120 days (lower panels). Rats were previously suckled in litters formed by 6 and 12 pups (respectively L6 and L12 condition). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 16 L6 rats and 25 L12 rats for body weight, and 15 L6 rats and 9 L12 rats for brain weight. Asterisks indicate that L12 weights are significantly lower than the corresponding L6 values ($p < 0.01$; unpaired t tests).

CSD-related ECoG potentiation

Application of 4% KCl for 30 minutes at a single point in the frontal cortex elicited multiple CSD episodes. The average number of CSD episodes observed in the three groups were as follows: 9.7 ± 6.4 (range: 4 to 17 CSD episodes) in the awake group, 6.5 ± 2.9 (range: 2 to 11 CSD episodes) in the tribromoethanol group, and 7.22 ± 1.30 (range: 6 to 10 CSD episodes) in the urethane+chloralose group.

For the same animal, the ECoG amplitude in the post-CSD period was significantly ($p < 0.01$) higher than in the baseline period (potentiation). Figure 2 shows ECoG recordings of 3 rats, representative from the awake, tribromoethanol and urethane+chloralose group. Compared with the 2-hour baseline period (left column), the ECoGs in the post-CSD period had higher amplitudes (final 2 hours of the recording; right column). The lower panel of Figure 2 shows the quantification of this CSD-related potentiation effect. Intragroup comparison (baseline period versus post-CSD period) at the near and remote recording points revealed a significant potentiation effect in all groups. Specifically, at the near point, there were amplitude increases of 43%, 61%, and 49% in the awake, tribromoethanol, and urethane+chloralose groups respectively ($p < 0.001$; paired t-test). In the remote point, the increases in the ECoG amplitude were 46%, 43% and 19% ($p < 0.01$; paired t-test).

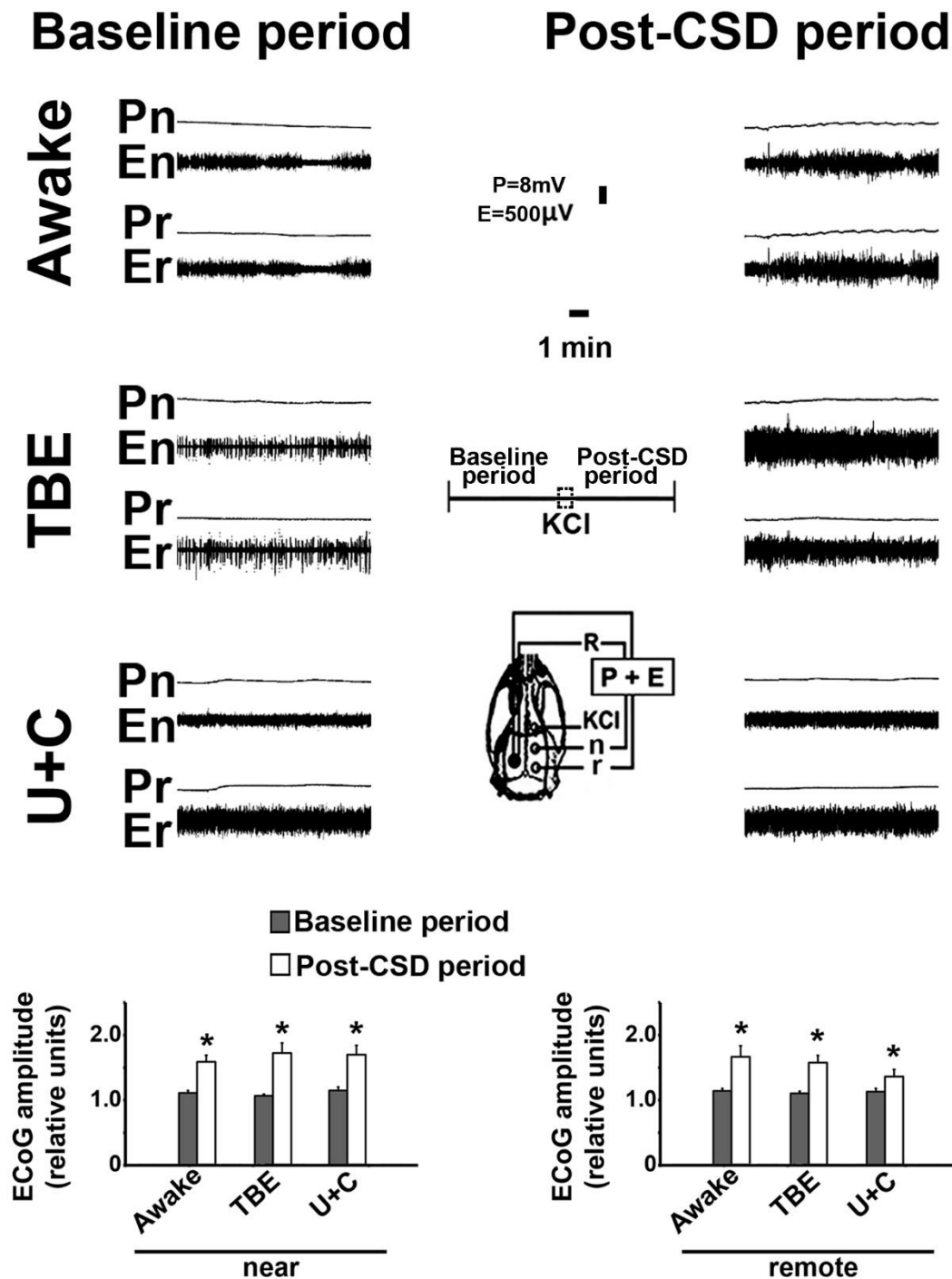


Fig. 2. The upper panels shows DC potential recordings (P) and electrocorticogram recordings (E) on the right hemispheres of three 90–120-day-old adult rats that were previously suckled under unfavorable lactation conditions (litters formed by 12 pups). The diagram of the skull shows the near (n) and remote (r) recording positions from which the traces marked at the left with the same letters were obtained. The position of the common reference electrode (R) on the left part of the skull and the application point of the CSD-eliciting stimulus (KCl) are also shown. The time diagram of the recording session (above the skull drawing) indicates the baseline period (120 min) the time of KCl application (30 min; dotted square) and the post-CSD period (120 min). In all three animals, there was an increase in the ECoG amplitude in the post-CSD period compared with the baseline ECoG for the same animals. In the post-

CSD period, the excerpted traces were taken at the following time points (t) after beginning CSD elicitation: Awake, t=70 min; tribromoethanol (TBE) group, t=130 min, and, urethane plus chloralose (U+C) group t=80 min. The lower panels show ECoG amplitudes of the awake (n=10), TBE (n=13), and U+C (n=11) groups of rats. Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. in relative units (amplitude values were normalized relative to the lowest value, which was considered equal to 1). The asterisk indicates an intragroup difference (baseline period versus post-CSD period; $p<0.01$; paired t-test).

Lactation condition and ECoG potentiation after CSD

To test whether the unfavorable lactation condition influences the CSD-related potentiation of the ECoG amplitude, we compared the present data on L12 rats with those of a previous study of our group on L6 animals. Data are compared in Fig. 3. In the L12 condition, both awake and anesthetized groups presented CSD-related ECoG potentiation at the two cortical recording points (near and remote to the CSD elicitation site). In the L6 condition, the potentiation occurred at the two cortical recording points only in the awake group, whereas the two L6 anesthetized groups displayed potentiation only at the near recording point ($p<0.01$; Mann-Whitney test).

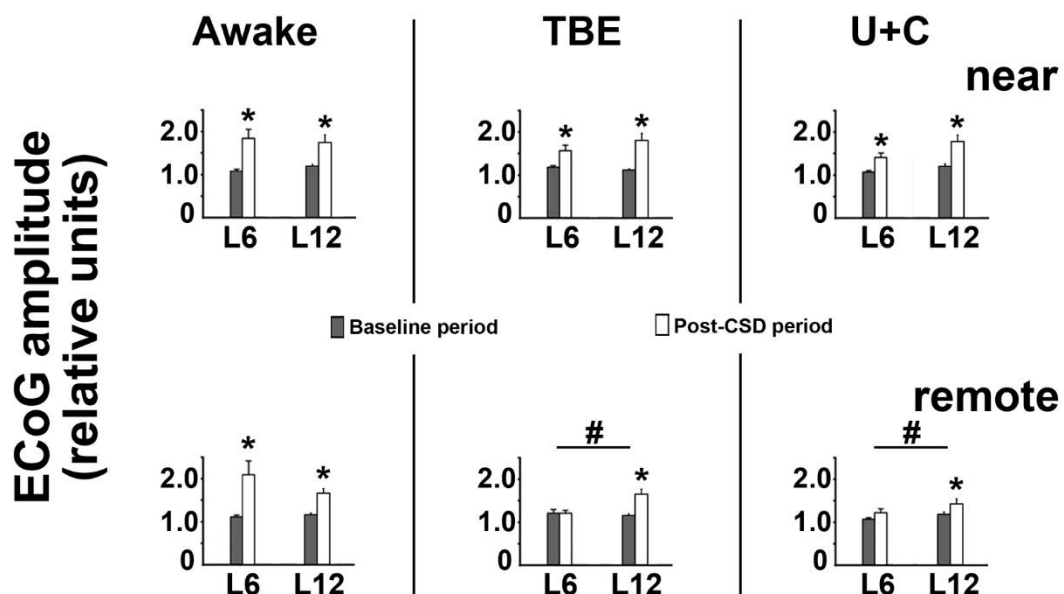


Fig 3. ECoG amplitudes of rats suckled in two distinct lactation conditions represented by litters with 12 and 6 pups (respectively L12 and L6 groups). L6 rats are from a previous study of our group, and are used here for comparison with the L12 animals. The average ECoG amplitude was calculated with the

support of an algorithm implemented in Matlab™. The amplitude values were normalized relative to the lowest value, which was considered equal to 1. Data are presented as mean±S.E.M. The asterisk indicates intragroup difference (baseline period *versus* post-CSD period in the same animal; $p<0.01$; paired t-test). The symbol # indicates intergroup difference in comparison with the L6 condition ($p<0.01$; Mann-Whitney test). This difference is observed at the remote, but not at the near recording point, and only under the action of anesthetic agents.

In the animals of the awake group that received implanted epidural electrodes, macroscopic examination of the cortical surface, immediately after the experiments, revealed that most animals showed some degree of pressure on the dura mater at the sites where the electrode tips were placed, but there were no signs of lesions. Histological examination of these regions indicated only punctiform alteration in a few cases that was restricted to the upper cortical layers. This did not seem to interfere with quantification of the ECoG potentiation effect since the recordings showed the same technical quality as previous acute recordings that were performed with non-implanted electrodes (Souza et al., 2011).

Discussion

Our results demonstrate that increasing the number of pups to be suckled by one dam (L12 condition) enhances the potentiation of electrocorticogram after spreading depression as compared with pups suckled in smaller size litters (L6 condition). We demonstrated this effect in rats anesthetized with two anesthetic types, but not in awake rats. The present data further extend our previous findings on post-CSD potentiation of ECoG in rats subjected to different nutritional conditions, and under urethane+chloralose anesthesia (Souza et al., 2011).

In this study, the L12 paradigm was effective in inducing nutritional deficiency as evaluated by the significant reduction in body and brain weights, compared to the L6 condition. These data confirm other studies on malnutrition provoked by manipulation of the litter size (Rocha-de- Melo et al., 2006; Amaral et al., 2009; Lima et al., 2009).

It is unlikely that the effect of potentiation of the ECoG activity is caused by the duration of the recording (4 hours). We have previously recorded the ECoG in rats for 4 hours, without application of KCl, and did not observe ECoG potentiation (Souza et al., 2011). Therefore, we conclude that this potentiation is a real synaptic change induced by CSD, as suggested previously (Faraguna et al., 2010; Souza et al., 2011). Furthermore, there is a similarity between the present findings *in vivo* in the rat cortex and the previously reported *in vitro* potentiation in the rat (Footitt and Newberry 1998; Gorji et al., 2004), and *in vivo* in the frog visual system (Guedes et al., 2005). This allows us to suggest that the post-CSD potentiation of the ECoG involves general properties of the nervous system of both non-mammals and mammals, including the human species (Gorji and Speckmann 2004).

The effects of early nutritional deficiency on the developing brain depend on factors such as the malnutrition timing, and the type and severity of the nutritional deprivation (Morgane et al., 1978). In the rat, the lactation period (the first three weeks of postnatal life) corresponds

to the most vulnerable period to many types of insults to the brain. This period of rapid development and growth of the nervous system is called the “brain growth spurt” period. During this early stage of life, the organs of this system are growing and developing through the processes of hyperplasia, hypertrophy and myelination. Moreover, at that stage the nutritional requirements for synthesis of cellular components are intense (Dobbing and Smart, 1974). Malnutrition occurring in this period probably results in decreased number and size of cell elements, with deficiency in the processes of dendritic development, synapse formation and myelination (Morgane et al., 2002; Picanço-Diniz et al., 1998). Interestingly, all these processes influence CSD propagation (Rocha-de-Melo et al., 2006; Merkler et al., 2009). It is important to add that malnourished rats present an increase in the brain levels of the enzyme glutamic acid decarboxylase (Díaz-Cintra et al., 2007) and a reduction in the brain glutamate uptake (Feoli et al., 2006), resulting in a state of increased extracellular glutamate. This could contribute to explain the ECoG potentiation after CSD.

Among the physiological processes that could explain the post-CSD potentiation, as well as its modulation by anesthetic agents, two types of mechanisms deserve special comments. These mechanisms are represented by activation processes at excitatory synapses (Bancila et al., 2010), and disinhibition processes at inhibitory synapses (Flores et al., 2014). Concerning the relationship between CSD and excitatory processes, it is known that activation of NMDA receptors elicits CSD (Somjen et al., 1992). Zhang et al. (2013) have shown that nutritional deprivation affects dendritic spines in cortical neurons. These authors suggest that undernutrition may impair the neuron’s ability to form stable connections and sustain acquired information in the dendrites. Thus, disturbed synaptic plasticity can alter the processing of synaptic connectivity with modification in the excitatory synaptic activity. Regarding the action of disinhibition processes on CSD, compelling evidence demonstrates that agonists (Amâncio-dos-Santos et al., 2006) and antagonists (Amâncio-dos-Santos et al.,

2013) of the serotonergic system can dichotomously modulate CSD in the rat cortex.

Furthermore, evidence is available indicating that neuronal activity regulates the dynamics and function of inhibitory synapses (Flores et al., 2014). In this context, anesthetic agents reduce neuronal activity (Bradley and Dray, 1973; Garret and Gan, 1998; Hara and Harris, 2002), and thus it could attenuate the post-CSD potentiation of ECoG as compared with animals that were recorded in the awake condition (Fig. 3). By the same logic, excitatory and/or inhibitory synaptic processes, which are altered by nutritional restriction (Zhang et al., 2013), could also modulate the post-CSD potentiation. Further investigation shall confirm the involvement of the two classes of mechanisms discussed above, determining whether these mechanisms act independently and concomitantly, or rather, act on a mutual exclusive basis.

The post-CSD ECoG potentiation occurred at the cortical recording point remote from the CSD elicitation site in the L12, but not in the L6 anesthetized (but not awake) condition, suggesting a cortical regional difference in the modulatory effects of the anesthetic agents that depends on the nutritional status. Notably, distinct brain regions react differently to pharmacological challenges in terms of CSD (Bogdanov et al., 2011), and regional differences in LTP in the visual cortex were reported in urethane-anesthetized rats (Kuo and Dringenberg, 2012). In addition, regional differences in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and spine density in the rat brain were recently reported (Yang, et al., 2015). Therefore, it is reasonable to postulate that there is an interaction between both factors (nutritional status *versus* anesthetics agents) at the remote recording region.

The post-CSD potentiation of the electrocorticographic activity might have clinical relevance. The appearance of CSD in the human brain has been related to human neurologic disorders, such as brain ischemia, migraine, and traumatic brain injury (Somjen et al., 1992; Dreier et al., 2011; Torrente et al., 2014). In vitro recordings have confirmed the occurrence of post-CSD potentiation in human brain tissue (Gorji and Speckmann, 2004). Collectively,

these data prompt us to postulate the possible involvement of post-CSD potentiation in the mechanisms of the above neurological disorders. The confirmation of such possibility waits for further investigation.

In conclusion, we demonstrated in adult rats that the cortical electrical activity is potentiated after CSD, and this effect is modulated by anesthetic agents and the lactation condition. The comparison of rats suckled in small and larger litters (L6 *versus* L12 groups) revealed that there is an interaction between lactation condition and the anesthetic state. We suggest that this post-CSD potentiation reflects changes in the processes underlying the balance between excitation and inhibition at cortical networks, probably involving neuron-glia interaction. The searching for the molecular mechanisms underlying this potentiation effect, as well as its importance for the human health shall be object of future investigation.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- No. 140703/2011-0), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no. 4191), and Capes (Edital 043/2013 Ciências Do Mar II). R.C.A. Guedes is a Research Fellow from CNPq (nº 301190/2010-0).

References

- Amâncio-dos-Santos, A., Maia, L.M., Germano, P.C., Negrão, Y.D., Guedes, R.C., 2013. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Eur. J. Pharmacol.* 706, 70-75.
- Amâncio-dos-Santos, A., Pinheiro, P.C.F., Lima, D.S.C., Ozias, M.G., Oliveira, M.B., Guimarães, N.X., Guedes, R.C.A., 2006. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Exp. Neurol.* 200, 275-282.
- Amaral, A.P.B.; Barbosa, M.S.S.; Souza, V.C.; Ramos, I.L.T.; Guedes, R.C.A., 2009. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrene enhances spreading depression in rats. *Exp. Neurol.* 219, 492-498.
- Bancila, V., Cordeiro, J.M., Bloc, A., Dunant, Y., 2009. Nicotine-induced and despotarisation-induced glutamate release from hippocampus mossy fibre synaptosomes: two distinct mechanisms. *J. Neurochem.* 110, 570–580.
- Bogdanov, V.B., Multon, S., Chauvel, V., Bogdanova, O.V., Prodanov, D., Makarchuk, M.Y., Schoenen, J., 2011. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiol. Dis.* 41, 430-435.
- Bradley, P.B., Dray, A., 1973. Modification of the responses of brain stem neurones to transmitter substances by anaesthetic agents. *Br. J. Pharmac.* 48, 212-224.
- Diaz-Cintra, S., Gonzalez-Maciel, A., Angel-Morales, M., Aguilar, A., Cintra, L., Prado-Alcalá, R.A., 2007. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfields of the dorsal hippocampus. *Exp. Neurol.* 208, 47-53.
- Dobbing, J., Smart, J.L., 1974. Vulnerability of developing brain and behavior. *Br. Med. Bull.* 30, 164-168.

- Dreier, J., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439-447.
- 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, 2939-2947.
- Feoli, A.M., Siqueira, I., Almeida, L.M., Tramontina, A.C., Battu, C., Wofchuk, S.T., Gottfried, C., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., 2006. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J. Nutr.* 136, 2357-2361.
- Flores, C.E., Nikonenko, I., Mendez, P., Fritschy, J-M, Tyagarajan, S.K., Muller, D., 2014. Activity-dependent inhibitory synapse remodeling through gephyrin phosphorylation. *PNAS*. E66-E72.
- Footitt, D.R., Newberry, N.R., 1998. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain Res.* 339-342.
- Garrett, K.M., Gan, J., 1998. Enhancement of γ -aminobutyric acidA receptor activity by α -chloralose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 680-686.
- Gorji, A., 2001. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 33-60.
- Gorji, A., Speckmann, E., 2004. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Europ. J. Neurosci.* 19, 3371-3374.
- Gorji, A., Zahn, P.K., Pogatzki, E.M., Speckmann, E.J., 2004. Spinal and cortical spreading depression enhance spinal cord activity. *Neurobiol. Dis.* 15, 70-79.
- Guedes, R.C.A., 2011. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. Preedy, V.R., Watson, R.R., Martin, C.R. (Eds.),

Handbook of Behavior, Food and Nutrition, New York, pp.2345-2355. DOI
10.1007/978-0-387-92271-3_148

- Guedes, R.C.A., Tsurudome, K., Matsumoto, N., 2005. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. *Brain Res.* 1036, 109-114.
- Hara, K., Harris, R.A., 2002. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth. Analg.* 94, 313–318.
- Kuo, M.-C., Dringenberg, H.C., 2012. Comparison of long-term potentiation (LTP) in the medial (monocular) and lateral (binocular) rat primary visual cortex. 1488, 51-59.
- Lauritzen, M., Dreier, J.P., Fabricius, M., Hartings, J.A., Graf, R., Strong, A.J., 2011. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J. Cerebr. Blood F. Met.* 31, 17-35.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359-390.
- Lima, D.S.C., Maia, L.M.S.S., Barboza, E.A., Duarte, R.A., Souza, L.S., Guedes, R.C.A., 2009. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. *Life Scienc.* 85, 241-247.
- Merkler, D., Klinker, F., Jürgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B.G., Sereda, M.W., Stadelmann-Nessler, C., Guedes, R.C., Brück, W., Liebetanz, D., 2009. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.* 66, 355-365.
- Morgane, P.J., Mokeler, D.J., Galler, J.R., 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosc. Biobeh. Rev.* 26, 471-483.

- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Ster, W., Fôrbes, W., Hall, R.; Bronzino, J., Kissane, J., Hawlyrewicz, E., Resnick, O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosc. Biobeh. Rev.* 2, 137-230.
- Picanço-Diniz, C.W., Araujo, M.S., Borba, J.M.C., Guedes, R.C.A., 1998. NADPHdiaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr. Neurosc.* 1, 35-48.
- Reid, C.W., Carmichael, K. P., Srinivas, S., Bryant, J.L., 1999. Pathologic changes associated with use of tribromoethanol (Avertin) in the sprague dawley rat. *Amer. Assoc. Lab. Animal Science*, 49.
- Rocha-de-melo, A.P., Cavalcanti, J.B., Barros, A.S., Guedes, R.C.A., 2006. Manipulation of rat little size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosc.* 9, 155-160.
- Saito, R., Graf, R., Hubel, K., Taguchi, J., Rosner, G., Fujita, T., Heiss, W., 1995. Halothane, but not alpha-chloralose, blocks potassium-evoked cortical spreading depression in cats. *Brain Res.* 699, 109–115.
- Seghatoleslam, M., Ghadiri, M.K., Ghaffarian, N., Speckmann, E-J., Gorji, A., 2014. Cortical spreading depression modulates the caudate nucleus activity. *Neuroscience* 267, 83-90.
- Somjen, G.G., Aitken, P.G., Czeh, G.L., Herrera, O., Jing, J., Young, J.N., 1992 Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, 248-254.
- Souza, T.K.M., Silva, M.B., Gomes, A.R., Oliveira, H.M., Moraes, R.B., 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, 463-469.

- Torrente, T., Cabezas, R., Avila, M.F., García-Segura, L.M., Barreto, G.E., Guedes, R.C.A., 2014. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? *Neurosci. Lett.* 565, 2-6.
- Yang, C., Shirayama, Y., Zhang, J.C., Ren, Q., Hashimoto, K., 2015. Regional differences in brain-derived neurotrophic factor and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* doi: 10.1093/ijnp/pyu121
- Zhang, Y., Wei, J., Yang, Z., 2013. Perinatal undernutrition attenuates field excitatory postsynaptic potentials and influences dendritic spine density and morphology in hippocampus of male rat offspring. *Neurosci.* 244, 31-41.

9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados dessa tese, pode-se concluir que:

- a diferença dos efeitos nos dois pontos corticais em que se registrou o ECoG indica diferenças regionais no córtex cerebral, quanto à potenciação associada à DAC em animais anestesiados, sugerindo que os agentes anestésicos modulam o efeito de potenciação do ECoG induzido pela DAC;
- essa potenciação é influenciada também pelas condições de lactação do animal;
- nos grupos que não sofreram DAC, as amplitudes não aumentaram, indicando que a potenciação do ECoG não depende da variável tempo, mas sim da ação da DAC no tecido cortical;
- a redução do peso corporal e encefálico, no grupo L12, confirma que essa condição de lactação foi efetiva em influenciar negativamente e de forma permanente o estado nutricional.

Visando dar continuidade a este trabalho, sugerem-se como perspectivas:

- investigar os efeitos do envelhecimento sobre a potenciação associada à DAC, comparando animais jovens e idosos;
- comparar se os efeitos dos anestésicos sobre a DAC pode diferir, estudando com detalhes eventuais diferenças na frequência, na amplitude e na duração da DAC sob a ação de cada anestésico;
- caracterizar essa potenciação em animais sob efeito de outros anestésicos;
- aprofundar o estudo do efeito de potenciação após a DAC em animais normoglicêmicos, hipoglicêmicos e hiperglicêmicos, e em distintas fases do desenvolvimento;
- Investigar possível ação direta da insulina na potenciação do ECoG, em experimentos com aplicação cortical tópica de insulina.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, N.E.; BENEVIDES, R.de D.L.; COSTA, B.L. da S.A.; GUEDES, R.C.A. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, p. 405-410, 2012.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, P.C.F; LIMA, D.S.C; OZIAS, M.G; OLIVEIRA, M.B; GUIMARÃES, N.X; GUEDES, R.C.A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, n.2, p.275-282, 2006.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.; GERMANO, P.C.; NEGRÃO, Y.D.; GUEDES, R.C. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal Pharmacology**, v.706, p. 70-75, 2013.
- AMARAL, A.P.B.; BARBOSA, M.S.S.; SOUZA, V.C.; RAMOS, I.L.T.; GUEDES, R.C.A. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. **Experimental Neurology**, v. 219, p.492-498, 2009.
- ANWYL, R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. **Neuropharmacology**, v. 56, p.735–740, 2009.
- BATISTA FILHO, M. Alimentação, nutrição e saúde. In: ROUQUAYOROL, M.Z. **Epidemiologia e saúde**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, supl. 1, p. S181-S191, 2003.
- BATISTA-OLIVEIRA, M.; MONTE-SIVA-MACHADO, K.K.; PAIVA, A.K.; LIMA, H.; FREGNI, F.; GUEDES, R.C.A. Favorable and unfavorable lactation modulates the effects of electrical stimulation on brain excitability: a spreading depression study in adult rats. **Life Sciences**, v. 91, p. 306-311, 2012.
- BERGER, M.; SPECKMANN, E-J.; PAPE, H.C.; GORJI, A. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. **Cephalalgia**, v.28, p.558-562, 2008.
- BORBA, J.M.C.; ROCHA-DE-MELO, A.P.; DOS SANTOS, A.A.; ANDRADE DA COSTA, B.L.S.; DA SILVA, R.P.; PASSOS, P.P.; GUEDES, R.C. A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, p. 144-150, 2010.
- BRADLEY, P.B., DRAY, A. Modification of the responses of brain stem neurones to transmitter substances by anaesthetic agents. **British Journal Pharmacology**, v. 48, p. 212-224, 1973.
- BRASIL**. Ministério da Saúde. Política nacional de alimentação e nutrição / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2. ed. rev. Brasília, 2003.
- CHOUDHURI , R; CUI, L; YONG, C. Cortical spreading depression and gene regulation: Relevance to migraine. **Annals of Neurology**, V.51, p.499-306, 2002.

CINTRA, L. DÚRAN, P.; ANGEL-GUEVARA, M.; AGUILAR, A.; CASTAÑÓN-CERVANTES, O. Pre and postnatal protein malnutrition alters the effect of rapid eye movements sleep-wake cycle and its frequency bands in the rat. **Nutritional Neuroscience**, v.5, p. 91-101, 2002.

COSTA-CRUZ, R.R.G., GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 303, p.177-180, 2001.

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, p. 271-275, 2006.

DEVONSHIRE, I.M.; GRANDY, T.H.; DOMMETT, E.J.; GREENFIELD, S.A. Effects of urethane anaesthesia on sensory processing in the rat barrel cortex revealed by combined optical imaging and electrophysiology. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, p.786-797, 2010.

DINELEY, K.T., JAHRLING, J.B., DENNER, L. Insulin resistance in Alzheimer's disease. **Neurobiology Disease**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.001>, 2014

DOBBING, J., SMART, J.L. Vulnerability of developing brain and behavior. **Brazilian Medical Bulletin**, v. 30, p. 164-168, 1974.

DREIER, J. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nature Medicine**, v. 17, p. 439-447, 2011.

DRINGENBERG, H.C.; BAKER, G.B.; URICHUK, L.J.; VANDERWOLF, C.H. Anti-serotonergic effects of urethane and chloral hydrate may not be mediated by a blockade of 5-HT₂ receptors. Short communication. **Journal of Neural Transmission**, v.103, p. 693-698, 1996.

ENGSTROM, D.A.; BENNETT, M.C.; STEVENS, K.E.; WILSON, R.L.; DIAMOND, D.M.; FLESHNER, M.; ROSE, G.M. Modulation of hippocampal primed burst potentiation by anesthesia. **Brain Research**, v. 521, p. 148-152, 1990.

FAO. Food and agriculture organization of united nations. Hunger map. Itália, 2014. [acesso em 05 dez 2014]. Disponível em: www.fao.org/fileadmim/templates/hunger_portal/img/map2014/poster_web_rev2.

FARAGUNA, U.; NELSON, A.; VYAZOVSKIY, V.V.; CIRELLI, C.; TONONI, G. Unilateral cortical spreading depression affects sleep need and induces molecular and electrophysiological signs of synaptic potentiation in vivo. **Cerebral Cortex**, v. 20, p. 2939-2947, 2010.

FIFKOVA, E. BURES, J.; KOSHTOYANTS, O.K.H.; KRIVÁNEK, J. & WEISS, T. Leão's spreading depression in the cerebellum of rat. **Experientia**, v.17, p. 572-573, 1961.

FOOTITT, D.R.; NEWBERRY, N.R. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. **Brain Research**, p. 339-342, 1998.

FORRESTER, T.E.; BADALOO, A.V.; BOYNE, M.S.; OSMOND, C.; THOMPSON, D. Prenatal factors contribute to the emergence of kwashiorkor or marasmus in severe undernutrition: evidence for the predictive adaptation model. **PLoS ONE**, v.4p., 2012

FRAZÃO, M.F; MAIA, L.M.S.S; GUEDES, R.C.A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v.4, n.47, p.26-30, 2008.

FRÍAS, V.; VARELA, O.; OROPEZA, J.J.; BISIACCHI, B.; ÁLVAREZ, A. Effects of prenatal protein malnutrition on the electrical cerebral activity during development. **Neuroscience Letters**, v. 482, p. 203-207, 2010.

GARRETT, K.M.; GAN, J. Enhancement of γ -aminobutyric acidA receptor activity by α -chloralose. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 680-686, 1998.

GORELOVA, N.A., KOROLEVA, V.I., AMEMORI, T., PAVLIK, V., BURES, J. Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats. **Electroencephalography Clinical. Neurophysiology**, v. 66, p. 440-447, 1987.

GORJI, A.; SPECKMANN, E. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues, **European Journal of Neuroscience**, v.19, p.3371-3374, 2004.

GRIEVE, P.G.; ISLER, J.R.; IZRAELIT, A.; PETERSON, B.S.; FIFER, W.P.; MYERS, M.M.; STARK, R.I. EEG functional connectivity in term age extremely low birth weight infants. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, p. 2712–2720, 2008.

GUEDES, R.C.A; TSURUDOME, K.; MATSUMOTO, N. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v. 1036, p.109-114, 2005.

GUEDES, R.C.A; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; MANHÃES-DE-CASTRO, R; COSTA-CRUZ, R.R.G. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v.5, n.2, p.115-123, 2002.

GUEDES, R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy; Ronald R Watson; Colin R Martin. (Org.). **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. 1 ed. London: Springer, v. 1, p. 2343-2355, 2011.

GUEDES, R.C.A. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience in: **Nutritional neuroscience**. In: LIEBERMAN, H; KANAREK, R; PRASAD, C (eds), "Nutritional Neuroscience: overview of an emerging field" New York: CRC Press; vol 3; 2005.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F. TEODÓSIO, N.R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1407-1412, 1996.

GUEDES, R.C.A.; BARRETO, JM. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 25, n. 4, p. 393-397, 1992.

GUEDES, R.C.A.; FRADE, S.F. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.26, p.1123-1128, 1993.

HACK, M.; BRESLAU, N.; WEISSMAN, B.; ARAM, D.; KLEIN, N.; BORAWSKI, E. Effects of very birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. **New England Journal of Medicine**, v. 325, p 321-327, 1991.

HARA,K; HARRIS, RA. The Anesthetic Mechanism of Urethane: The Effects on Neurotransmitter-Gated Ion Channels. **Anesthesia Analgesia**, n.94,p.313–8, 2002.

HAVRANKOVA, J., SCHMECHEL, D.E., ROTH, J., BROWNSTEIN, M. Identification of insulin in the rat brain. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 75, p. 5737–5741, 2013.

HETZEL, B.S. Iodine deficiency and the brain. **Nutritional Neuroscience**, v.2, p. 375-384, 1999.

HOFFMANN, U., SUKHOTINSKY, I., EIKERMANN-HAERTER, K., AYATA, C. Glucose modulation of spreading depression susceptibility. **Journal of Cerebral. Blood Flow Metabolism**, v. 33, p. 191-195, 2013.

JOHNSTONE, V.P.; RAYMOND, C.R. A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation. **Learning & Memory**, v.18, p. 625-633, 2011.

KAZERANI, R.H.; FURMAN, B.L. Comparison of urethane/chloralose and pentobarbitone anaesthesia for examining effects of bacterial lipopolysaccharide in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.20, p. 379-384, 2006.

KENDING, J.J.; MACIVER, M.B.; ROTH, S.H. Anesthetic actions in the hippocampal formation. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 625, p. 37-53, 1991.

KITAHARA, Y.; TAGA, K.; ABE, H.; SHIMOJI, K. The Effects of Anesthetics on Cortical Spreading Depression Elicitation and c-fos Expression in Rats. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v.13, p. 26-31, 2001.

KUDO, C.; NOZARI, A.; MOSKOWITZ, M.A.; AYATA, C. The impact of anesthetics and hyperoxia on cortical spreading depression. **Experimental Neurology**, v. 212, p.201-206, 2008.

LEÃO, A.A.P. Further observation, on spreading depression of activity in cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v.10, p. 409-414, 1947a.

LEÃO, A.A.P. The slow voltage variation of spreading depression of activity. **Journal of Neurophysiology**, v.10, p. 409-414, 1947b.

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

LEÃO, A.A.P.; MARTINS-FERREIRA, H. Nota acerca da depressão alastrante no cerebelo, tubérculo quadrigêmeo anterior e bulbo olfativo. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.33, p. XXXIX-XL, 1961.

LEÃO, A.A.P.; MARTINS-FERREIRA, H. Nota sobre a ocorrência da depressão alastrante no hipocampo e no corpo estriado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 30, p. I, 1958.

LIMA, C.B.; SOARES, G.S.F.; VITOR, S.M.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.; CASTELLANO, B.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **Internacional Journal Developmental Neuroscience**, 33, p. 98-105, 2014.

LIMA, C.B.; SOARES, G.S.F.; VITOR, S.M.; CASTELLANO, B.; COSTA, B.L.S.A.; GUEDES, R.C.A. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. **Life Sciences**, v.93, p.388-392, 2013.

LIMA, D.S.C.; MAIA, L.M.S.S.; BARBOZA, E. A; DUARTE, R.A; SOUSA, L.S; GUEDES, R.C.A. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v.85, n.2, p.241-247, 2009.

LYNCH, G.; REX, C.S.; GALL, C.M. LTP consolidation: substrates, explanatory power and functional significance. **Neuropharmacology**, v.52, p. 12-23, 2007.

MAHERAS, J.K.; GOW, A. Increased anesthesia time using 2,2,2-tribromoethanol-chloral hydrate with low impact on mouse psychoacoustics. **Journal of Neuroscience Methods**, n. 219, p. 61– 69, 2013.

MAIA, L.M.S.S.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; DUDA-DE-OLIVEIRA, D.; ANGELIM, M.K.C.; GERMANO, P.C.P.; SANTOS, S.F.; GUEDES, R.C.A. 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, 2009.

MAIA, L.M.S.S.; FRAZÃO, M.F.; SOUZA, T.K.M.S.; SILVA, M.B.; ROCHA-DE-MELO, A.P.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v.1072, p.19-25, 2006.

MAIA, L.M.S.S.; SANTOS, A.A. Alimentos e suas ações em sistemas fisiológicos. **Veredas Favip**, v. 2, p. 24–34, 2006.

MACDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABA_A receptor channels. **Annual Review Neuroscience**, v.17, p. 569-602, 1994.

MACIVER, M.B.; TANELIAN, D.L.; MODY, I.; Two mechanisms for anesthetic-induced enhancement of GABA_A-mediated neuronal inhibition. **Annals of the New York of the Academy Sciences**, v, 625, 91-96, 1991.

MENDES-DA-SILVA, R.F.; LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; BANDIM-DA-SILVA, M.E.; CAVALCANTI, G.A.; RODRIGUES, A.R.O.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.;

GUEDES, R.C.A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 155-160, 2014.

MIYAZAWA, D.; YASUI, Y.; YAMADA, K.; OHARA, N.; OKUYAMA, H. Regional differences of the mouse brain in response to an α -linolenic acid-restricted diet: Neurotrophin content and protein kinase activity. **Life Science**, v.37, p. 490-494, 2010.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil: implicações para políticas públicas. In: **SEMINÁRIO ESPECIAL FOME E POBREZA**. Rio de Janeiro, 2003.

MONTE-GUEDES, C.K.R.; ALVES, E.V.S.; VIANA-DA-SILVA, E.; GUEDES, R.C.A. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, p. 191-194, 2011.

MONTEIRO, H.M.C.; SILVA, D.L.; FRANÇA, J.P.B.D.; MAIA, L.M.S.S.; ANGELIM, M.K.C. AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Differential effects of physical exercise and L-Arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, p. 112-118, 2011.

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

MORGANE, P.J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p 92-128, 1993.

MORGANE, P.J.; MILLER, M; KEMPER, T.; STER, W.; FÖRBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWLYREWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.2, p. 137-230, 1978.

MUHAMMAD, S.; BARAKAT, W; STOYANOV, S. MURIKINATI, S., YANG, H., TRACEY, K.J., BENDSZUS, M., ROSSETTI, G., NAWROTH, P.P., BIERHAUS, A., SCHWANINGER, M. The hmgb1 receptor rage mediates ischemic brain damage. **The Journal of Neuroscience**, v.12, n. 28(46), p.12023–12031, 2008.

NICOLL, R.A; ROCHE, K.W. Long-term potentiation: peeling the onion. **Neuropharmacology**, v.74, p. 18-22, 2013.

NICHOLS, B.L. Malnutrition in developing countries: clinical assessment. **Up To Date**, 2012.

OKUMURA, A.; HAYAKAWA, M.; OSHIRO, M.; HAYAKAWA, F.; SHIMIZU, T.; WATANABE, K. Nutritional state, maturational delay on electroencephalogram, and developmental outcome in extremely low birth weight infants. **Brain & Development**, v 32, p. 613-618, 2010.

PEROUANSKY, M.; BARANOV, D.; SALMAN, M.; YAARI, Y.; Effects of halothane on glutamate receptor-mediated excitatory postsynaptic currents. **Anesthesiology**, v. 83, p. 109-119, 1995.

PICANÇO-DINIZ, C.W.; ARAÚJO, M.S; BORBA, J.M.C.; GUEDES, R.C.A. NADPHdiaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 35–48, 1998.

RANADE, S.C.; ROSE, A.; RAO, M.; GALLEG0, J.; GRESSENS, P. Many different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. **Neuroscience**, v.152, p. 859-866, 2008.

REID, C.W.; CARMICHAEL, K. P.; SRINIVAS,S.; BRYANT, J.L. Pathologic changes associated with use of tribromoethanol (Avertin) in the sprague dawley rat. **American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, 1999.

ROCHA-DE-MELO, A.P; CAVALCANTI, J.B; BARROS, A.S; GUEDES, R.C.A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutrition Neuroscience**, v.9, n.4, p.155-160, 2006.

ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previous submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p. 663-669, 1997.

SADGROVE, M.P., BEAVER, C.J., TURNER, D.A. Effects of relative hypoglycemia on LTP and NADH imaging in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1135, p.30-39, 2007.

SAITO, R., GRAF, R., HUBEL, K., TAGUCHI, J., ROSNER, G., FUJITA, T., HEISS, W. Halothane, but not alpha-chloralose, blocks potassium-evoked cortical spreading depression in cats. **Brain Research**, v.699, p.109–15, 1995.

SANTOS, R.S. **Nutrição, hipertiroidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados.** (2000) Tese (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SCRIMSHAW, N.S.; GORDON, J.E. Malnutrition, learning and behavior. **MIT. Press**, Cambridge/MA, 1968.

SHINOHARA, M., DOLLINGER, B., BROWN, G., RAPOPORT, S., SOKOLOFF, L. Cerebral glucose utilization: local changes during and after recovery from spreading cortical depression. **Science**, v. 203, p. 188–190, 1979.

SILVA, A.; COSTA, F.B.R.; COSTA, J.A.; TEODÓSIO, N.R.; CABRAL-FILHO, J.E.; GUEDES, R.C.A. Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human "basic regional diet" of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.20, p. 383–392, 1987.

SOMJEN, G.G.; AITKEN, P.G.; CZECH, G.L.; HERRERA, O.; JING, J.; YOUNG, J.N. Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 70, p. 248-254, 1992.

SOUBASI, V.; MITSAKIS, K.; NAKAS, C.T.; PETRIDOU, S.; SARAFIDIS, K.; GRIVA, M.; AGAKIDOU, E.; DROSSOU, V. The influence of extrauterine life on the aEEG maturation in normal preterm infants. **Early Human Development**, v.85, p. 761-765, 2009.

SOUZA, T.K.M.; SILVA, M.B.; GOMES, A.R.; OLIVEIRA, H.M.; MORAES, R.B.; FREITAS BARBOSA, C.T.; GUEDES, R.C.A. 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, p. 463-469, 2011.

STREIT, D. S.; FERREIRA-FILHO, C. R.; MARTINS-FERREIRA, H. Spreading Depression in Isolated Spinal Cord. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, p. 887-890, 1995.

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

TANELIAN, D.L.; KOSEK, P.; MODY, I.; MACIVER, M.B.; The role of the GABA_A receptor/chloride channel complex in anesthesia. **Anesthesiology**, v. 78, p. 757-756, 1993.

TENORIO, A.S.; OLIVEIRA, I.D.V.A.; GUEDES, R.C.A. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.27,p.431-437, 2009.

TIAN, Y.; LEI, T.; YANG, Z.; ZHANG, T. Urethane suppresses hippocampal CA1 neuron excitability via changes in presynaptic glutamate release and in potassium channel activity. **Brain Research Bulletin**, n 87,p. 420– 426, 2012.

TORRENTE, T.; CABEZAS, R.; AVILA, M.F.; GARCÍA-SEGURA, L.M.; BARRETO, G.E.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 2-6, 2014.

TORRENTE, D.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; LOPES, A.A.C.; GONZÁLEZ, J.; BARRETO, G.E.; GUEDES, R. C.A. Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 87-90, 2014.

VAN DER HEIDE, L.P., RAMAKERS, G.M., SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Progress Neurobiology**, v.79, p. 205–221, 2006.

VAN HARREVELD, A., STAMM, J.S. Effect of pentobarbital and ether in the spreading cortical depression. **American Journal Physiology**,. v. 173, p. 164-170, 1953.

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

XIMENES-DA-SILVA, A; GUEDES, RCA. 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 Medicine and Biological Research**, v. 24, n. 12, p. 1277-1281, 1991.

YANG, Y.; CALAKOS, N. Presynaptic long-term plasticity. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v.5, p. 1-21, 2013. ZIMMERMAN, S.A.; JONES, M.V.; HARRISON, N.L. Potentiation of gammaaminobutyric acid receptor Cl-current correlates with in vivo anesthetic potency. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 270, p. 987-991, 1994.

ZHANG, Y.; WEI, J.; YANG, Z. Perinatal undernutrition attenuates field excitatory postsynaptic potentials and influences dendritic spine density and morphology in hippocampus of male rat offspring. **Neuroscience**, v. 244, p. 31-41, 2013.

ANEXO 01: Parecer do Comitê de ética em pesquisa

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, 26 de outubro de 2011.

Ofício nº 417/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes**
Departamento de Nutrição-UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.021545/2011-32

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 nutrição-agentes anestésicos: efeitos eletrofisiológicos sobre a excitabilidade cerebral em ratos adultos"**.

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 Wistar; Sexo: Machos; Idade: 90 a 120 dias; Peso: entre 300-350 gramas; Número de animais previsto no protocolo: 60 animais.

Atenciosamente,



Prof.ª Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO 02: Comprovante de submissão do artigo 1

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

From: **Neuroscience Letters** <nsf@elsevier.com>
Date: 2015-01-22 10:47 GMT-02:00
Subject: NSL-14-2108R1: Confirmation of Revision Received
To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Ms. No.: NSL-14-2108R1

Title: Anesthetic agents modulate ECoG potentiation after spreading depression, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect

Corresponding Author: Prof. Rubem C.A. Guedes

Article Type: Research Paper

Dear Prof. Guedes,

We have received your revised submission for consideration in Neuroscience Letters.

You may check the status of your manuscript by logging onto the Elsevier Editorial System:

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

Your username is: guedes.rca@gmail.com

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

Kind regards,

Neuroscience Letters
Email: nsf@elsevier.com

ANEXO 03: Comprovante de submissão do artigo 2

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

From: **Life Sciences** <lifesci@elsevier.com>

Date: 2015-02-03 17:26 GMT-02:00

Subject: Submission Confirmation

To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Dear Prof. Guedes,

Your submission entitled "Interaction between unfavorable lactation and anesthetic agents on the potentiation of electrocorticogram after spreading depression in adult rats." has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences