



THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUZA



**NUTRIÇÃO E EXCITABILIDADE CORTICAL: EFEITOS
DE POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA
ASSOCIADA À DEPRESSÃO ALASTRANTE**

**Recife
2011**

THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUZA

**NUTRIÇÃO E EXCITABILIDADE CORTICAL: EFEITOS
DE POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA
ASSOCIADA À DEPRESSÃO ALASTRANTE**

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

Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes
Profº Titular do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

**Recife
2011**

Souza, Thays Kallyne Marinho de
Nutrição e excitabilidade cortical: efeitos de
potenciação da atividade elétrica associada à depressão
alastrante / Thays Kallyne Marinho de Souza. – Recife: O
Autor, 2011.

65 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Rubens Carlos Araújo Guedes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Depressão alastrante cortical. 2. Desnutrição.
3. Excitabilidade cerebral. 4. Potenciação de longa
duração. I. Guedes, Rubens Carlos Araújo. II. Título.

616.39

CDD
(20.ed.)

UFPE
CCS201
1-055

THAYS KALLYNE MARINHO DE SOUZA

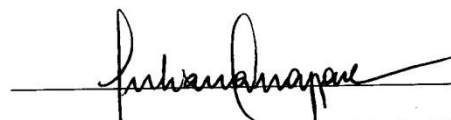
**NUTRIÇÃO E EXCITABILIDADE CORTICAL: EFEITOS
DE POTENCIAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA
ASSOCIADA À DEPRESSÃO ALASTRANTE**

Dissertação aprovada em: 16 de Fevereiro de 2011.

Banca Examinadora:



Profª Angélica da Silva Tenório/ UFPE



Profª Juliana Maria Carrazzone Borba/ UFPE



Profº Luís Bezerra de Carvalho Júnior/ UFPE

Recife
2011.

Àquele que sempre torceu e cuidou de mim e que agora sei que continua a fazer isto, só que de um plano espiritual mais superior. Você através de sua simplicidade e generosidade me ensinou os mais sublimes valores da vida. Esta conquista é dedicada a você meu Avô e anjo, João Marinho da Silva (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor da Vida, que sempre iluminou o meu caminho;

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, minha fortaleza e inspiradora, de quem a cada dia mais me orgulho de ser filha e tento retribuir com o melhor que consigo, e você minha irmã, seu orgulho é minha grande satisfação. Grande parte deste mérito é de vocês duas, que tanto me dão força e acreditam no meu potencial;

Ao meu orientador Professor Rubem Carlos Araújo Guedes, exímio exemplo de pesquisador, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela paciência e por acreditar na minha capacidade, desde os meus passos iniciais na iniciação científica. Com sua competência me ensinou como é prazerosa a pesquisa científica;

À Mariana Barros e Silva, amiga e irmã, pela amizade e presença constante na minha vida e por ter desenvolvido comigo parte desses resultados;

À tia Dora, que tantas vezes deixou a tranquilidade de seu lar para nos acompanhar até o laboratório sou grata pela amizade, confiança, palavras de carinho e conforto e principalmente pelas orações;

Às minhas amigas: Amanda, Gisélia, Michelle, Danielle, Daniela, Heloisa, Claudete, Rebecca, Leila, Isis e Celina. Cada uma delas tem uma participação especial na minha vida e contribuíram para que eu pudesse alcançar o término desta caminhada, sou muita grata por vocês fazerem parte da minha vida;

Não podia esquecer você, minha também irmã, Edynara Cristiane de Castro Azevedo, pelo seu apoio e incentivo, a sua amizade é um dos maiores presentes concedidos por Deus;

Aquelas pessoas que simplesmente aparecem em nossa vida e nos marcam para sempre. Obrigada por fazerem parte da minha história: Marília Ferreira Frazão, Luciana Maria Silva de Seixas Maia, Rodrigo (Kiko), D. Verônica, Júnior e Wilson;

Ao Prof. Hélio Magalhães e André Ricardson Gomes, pela ajuda e colaboração durante o trabalho realizado;

Ao professor Catão e Renato pela colaboração na coleta e análise de alguns dados;

A todos os estagiários do LAFINNT, em especial Aline, Philipe, Amanda e Roberta pela ajuda em vários momentos;

Ao veterinário Edeones França, pelo fornecimento dos animais;

Aos amigos do LAFINNT e funcionários do Departamento de Nutrição;

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

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.

Martin Luther King

Resumo

O fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC) é influenciado por alterações da excitabilidade do cérebro, e tem sido utilizado como modelo para o estudo dessa excitabilidade. Após a ocorrência da DAC, tem sido encontrado um aumento na atividade elétrica neural e sináptica. Isto poderia sugerir uma relação entre a DAC e o fenômeno neural conhecido como LTP (do inglês "*Long-term potentiation*"). A LTP corresponde a um aumento persistente na atividade sináptica (plasticidade neuronal) que tem sido associado com aprendizagem e memória (IZQUIERDO, 2008). O objetivo foi investigar em ratos adultos (90-120 dias) nutridos e desnutridos se a presença da DAC potencia a atividade elétrica espontânea e evocada do córtex cerebral. Ratos Wistar machos, nutridos (N- amamentados em ninhadas de 6 filhotes; n=10), desnutridos no aleitamento (D - amamentados em ninhadas de 12 filhotes; n=10) e com restrição alimentar na vida adulta (RA - receberam 70% da dieta consumida por animais nutridos; n=7), foram anestesiados e submetidos ao registro "basal" da atividade elétrica cortical espontânea (ECoG), na região parietal direita, em dois pontos denominados "anterior" (a) e "posterior" (p), durante 2h. Após este período, a DAC passou a ser deflagrada, a cada 20min, com KCl a 2% e o ECoG, bem como a variação lenta de voltagem que acompanha a DAC, foram registrados por mais 2h. Em cada hora do registro, amostras de aproximadamente 10 minutos dos registros em papel foram digitalizadas e analisadas por meio de um algoritmo específico e as amplitudes do ECoG foram convertidas em unidades relativas. Em comparação com os valores basais, as amplitudes no período com DAC aumentaram significativamente ($p<0,05$) no ponto a, nos três grupos (aumentos de 13% a 23%). No ponto p, o aumento da amplitude (de 22%) foi significativo apenas no grupo D. Um quarto grupo, no qual não se provocou a DAC, apresentou amplitudes semelhantes durante as 4 horas do registro. A resposta cortical evocada por estimulação elétrica trans-calosa também apresentou um aumento de 20 e 40% (nos grupos N e D, respectivamente), após a DAC, em relação aos valores basais. Os resultados: (1) reforçam a hipótese de que no rato a DAC potencia a atividade elétrica cortical espontânea e evocada "*in vivo*", sugerindo efeito semelhante à LTP; (2) indicam a existência de diferenças regionais no tecido cortical, quanto a esse efeito; (3) sugerem que essa potenciação é modulada pelo estado nutricional.

Palavras chave: Depressão alastrante cortical, Desnutrição, Excitabilidade cerebral, Potenciação de longa duração.

Abstract

The phenomenon of cortical spreading depression (CSD) is influenced by changes in brain excitability, and has been used as a model for excitability studies. After the occurrence of CSD, an enhancement in neural and synaptic activities has been found. This could suggest a relationship between CSD and the phenomenon known as neuronal LTP, Long-term potentiation. LTP represents a persistent increase in synaptic activity (neural plasticity) that has been associated with learning and memory (Izquierdo, 2008). The aim of this work was to investigate in adult rats (90-120 days), well-nourished and malnourished, whether the presence of CSD potentiates the spontaneous and evoked electrical activity in the cerebral cortex. Male Wistar rats were suckled in litters of six or twelve pups (respectively W and M groups; $n=10$ in each group). A third group in the w-condition was submitted to food restriction at adulthood for 21 days (starting at postnatal day 70; FR group; $n=7$). At 90-120days, the animals of the three groups were anesthetized and submitted to a baseline ECoG recording for 2h, followed by 2 additional h in which CSD was elicited every 20 min. CSD was recorded at two parietal points, called anterior (**a**) and posterior (**p**). Compared with the baseline values, the amplitudes in the CSD period increased significantly ($p < 0.05$) at the point **a** in the three groups (increases of 13% to 23%). At the point **p**, the increase in amplitude (22%) was significant only in group M. A fourth control group (5 rats in the W condition), which was not submitted to CSD, showed similar amplitudes during the 4 hours of recording. Transcallosal electrically evoked cortical responses also presented a post-CSD 20% and 40% amplitude increases in the W- and M-rats, respectively. The results: (1) support the hypothesis that in the rat CSD potentiates the spontaneous and evoked brain electrical activity in vivo, suggesting a LTP-like effect, (2) indicate the existence of regional differences in cortical tissue, concerning this effect; (3) suggest that this potentiation is modulated by the nutritional status.

Keywords: Cortical spreading depression, Malnutrition, Cerebral excitability, Long-term potentiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 – Esquema da Depressão cortical alastrante	18
Fig.2 – Modelo de indução da Potenciação de longa duração	20
Fig.3 - Descrição dos grupos estudados.....	24
Fig.4 – Registro eletrofisiológico com inscrição em papel (ECoG e VLV).....	27
Fig. 5 – Representação de parte do Registro eletrofisiológico (ECoG) – etapa de binarização	28
Fig.6 – Representação de parte do Registro eletrofisiológico – etapa filtragem do ruído do tipo “sal” e “pimenta”	28
Fig.7 – Vetores que formam as envoltórias em torno do traçado do ECoG	29

Figuras do artigo

Fig.1 – Pesos corporais

Fig.2 – Registros eletrofisiológicos

Fig.3 – Amplitudes do ECoG

Fig.4- Registro da atividade elétrica evocada

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Analógica

a – anterior

AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

CCS - Centro de Ciências da Saúde

D - Digital

DAC - Depressão Alastrante Cortical

dpi - Pontos por Polegada (do inglês “dots per inch”)

ECoG – Eletrocorticograma

Glu – Glutamato

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

p - posterior

SNC - Sistema Nervoso Central

TDF - Transformada Discreta de Fourier

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

VLV - Variação Lenta de Voltagem

SUMÁRIO

1.0 APRESENTAÇÃO.....	12
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Nutrição e Funções Neurais.....	14
2.2 Nutrição e Depressão Alastrante Cortical	16
2.3 Depressão alastrante e “potenciação de longa duração” (LTP)	18
3.0 HIPÓTESES.....	22
4.0 MÉTODOS.....	23
4.1 Animais.....	23
4.2 Pesos Corporais.....	24
4.3 Procedimento cirúrgico e Registro eletrofisiológico.....	24
4.4 Estimulação cortical	25
4.5 Digitalização do ECoG e análise dos dados	26
5.0 RESULTADOS – Artigo Original.....	30
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7.0 REFERÊNCIAS	56
8.0 ANEXOS	62

1.0 APRESENTAÇÃO

A deficiência de um ou mais nutrientes na dieta pode, sem dúvida, perturbar a organização bioquímica e morfológica do cérebro, e isto é geralmente acompanhado de repercussões na sua função (GUEDES, 2005). Sob essas condições, a atividade eletrofisiológica 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 ainda afeta um número impressionante de crianças e isso tem influenciado 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, em investigar em animais de laboratório, os efeitos da desnutrição precoce no sistema nervoso central adulto, bem como as suas repercussões na atividade elétrica cerebral, utilizando para isto o modelo experimental conhecido como depressão alastrante cortical (DAC).

A potenciação de longa duração (LTP) é um fenômeno neural que foi observado inicialmente no hipocampo e corresponde a um aumento persistente na intensidade sináptica (plasticidade neuronal) associado com aprendizagem e memória (IZQUIERDO, 2008; MALENKA, 2003).

A DAC é outro 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), ele 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 LTP.

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que o fenômeno da DAC pode induzir um efeito semelhante à LTP *in vitro*, ainda são raros os estudos *in vivo* sobre esse tema. Por essas razões, considera-se importante a presente investigação, para tentar determinar se esse efeito, associado à DAC, pode ser também observado em mamíferos *in vivo*. Neste caso, tal efeito poderia ser influenciado pelo estado nutricional do organismo. Sabe-se que a desnutrição no início da vida pode reduzir o número de células do cérebro e as suas conexões, tanto em animais de laboratório como em

humanos, com repercussões eletrofisiológicas duradouras (GUEDES, 2005; MORGANE et al., 1978). No entanto, pouco se sabe acerca dos efeitos neurais da restrição alimentar, quando esta incide na vida adulta.

Os resultados da presente investigação estão contidos em um artigo original intitulado ***Increased cortical excitability after spreading depression in well-nourished and malnourished rats: in vivo spontaneous and evoked potential analysis***, o qual foi submetido à publicação na revista **Experimental Neurology**, esta é classificada como qualis internacional A1 pela Capes, com fator de impacto de 3,194 e divulga artigos na área de Neurociências, com destaque para o desenvolvimento neural, regeneração e plasticidade (ANEXO A). Este artigo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos da DAC, em potencializar a atividade eletrocorticográfica espontânea e evocada, em ratos adultos previamente submetidos a condições nutricionais favoráveis ou desfavoráveis de lactação, bem como em animais expostos a um período de restrição alimentar, na vida adulta.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nutrição e Funções Neurais

O estado de nutrição de um organismo expressa a disponibilidade e o aproveitamento metabólico de energia e nutrientes no nível de suas células e tecidos. Trata-se de uma condição resultante de duas grandes vertentes: o consumo de alimentos, por um lado, e a sua utilização biológica, por outro (BÉGHIN, 1990).

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).

A desnutrição, principalmente em países em desenvolvimento, ainda se constitui em um grave problema social. Apesar dos avanços alcançados na redução da prevalência desse problema, estima-se que cerca de 55% das mortes infantis nos países em desenvolvimento estão ligadas à desnutrição (PNAN, 2003). Quando incide em crianças, torna-se um problema de saúde pública, seja isolada ou associada a outros fatores que aumentam a morbimortalidade (WARTELOW, 1997).

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 & SANTOS, 2006).

A deficiência nutricional é mais nociva 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 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 & SMART, 1974). Nessa fase ocorre também um rápido aumento 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 & 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 (BALLABRIGA, 1989; MORGANE et al, 1978).

A desnutrição durante o período de desenvolvimento pode acarretar certas mudanças como: alteração da atividade enzimática, maior densidade de empacotamento celular, diminuição do número de células e de lipídios, com prejuízo a mielinização – (DOBBING, 1970; KRIGMAN & HOGAN, 1976; DOBBING & SMART, 1974).

Estudos atuais 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 & 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 (PURVES et al, 2005).

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 (BARRET & RADKE-YARROW, 1985; HACK et al., 1991; RANADE et al., 2008; STRUPP & LEVITSKY, 1995).

Dentre os modelos experimentais para se provocar a desnutrição, a técnica de manipulação do tamanho das ninhadas vem se mostrando eficaz, sendo o método utilizado no presente trabalho. 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.

O ponto final do desenvolvimento do sistema nervoso, isto é, quando o mesmo torna-se definitivamente adulto, é difícil de ser determinado. Isto porque o sistema continua a se transformar, embora em uma velocidade menor durante a vida adulta. Durante anos, acreditou-se que o sistema nervoso não apresentaria a mesma capacidade regenerativa dos demais tecidos, porque os neurônios tornar-se-iam incapazes de regenerar. Na verdade, a maioria dos neurônios adultos mostra-se incapaz de proliferar. No entanto, constatou-se que o sistema nervoso de animais adultos apresenta células-tronco, em locais estratégicos, capazes de proliferar e gerar novos neurônios (LENT, 2004).

Se introduzirmos ao estudo do sistema nervoso a variável tempo, podemos formular algumas questões. Apesar da maioria das células neurais não conseguirem proliferar na vida adulta, alguns processos continuam ocorrendo. Então, considera-se também interessante investigar se o estado nutricional deficiente na vida adulta acarretaria prejuízos nos fenômenos eletrofisiológicos aqui estudados, bem como se este ocorreria na mesma intensidade que ocorre no início da vida.

2.2 Nutrição e Depressão Alastrante Cortical

O fenômeno conhecido como “depressão alastrante cortical” (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 provocam uma resposta do córtex cerebral caracterizada por acentuada depressão 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, em 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 dez a quinze minutos todo o tecido cortical acha-se recuperado (GUEDES et al., 2004).

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 1).

Quanto à sua ocorrência, a DAC tem sido demonstrada não só em córtex cerebral de mamíferos, incluindo o homem, como também em aves, répteis e anfíbios. O fenômeno já foi evidenciado em várias estruturas do SNC (Sistema Nervoso Central) como núcleo caudado, tubérculo quadrigêmio, bulbo olfatório, córtex cerebelar e teto óptico (BERGER et al., 2008; FIFKOVA et al., 1961; GORJI & SPERCKMANN, 2004; GUEDES et al., 2005; LEÃO & MARTINS FERREIRA, 1958, 1961).

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 três doenças neurológicas humanas: epilepsia, enxaqueca e isquemia cerebral. Isto é verdadeiro, inclusive, no que se refere ao aumento, pós-DAC, da atividade elétrica do tecido neural, semelhante à potenciação de longa duração (LTP; do inglês “long term potentiation”). Nosso laboratório tem demonstrado que algumas condições de interesse clínico podem aumentar a susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC, na qual a velocidade de propagação torna-se maior. Dentre essas condições, têm-se a redução da concentração extracelular de cloreto (GUEDES & do CARMO, 1980), a desnutrição (GUEDES et al., 1987; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997), a hipoglicemia (COSTA CRUZ & GUEDES, 2001; XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991), o consumo de etanol (GUEDES & FRADE, 1993) o hipertireoidismo (SANTOS, 2000), bem como a deaferentação sensorial (TENÓRIO et al., 2009), o tratamento com L-arginina (MAIA et al., 2009), com L-glutamina (LIMA et al., 2009) e com dipirona (AMARAL et al., 2009).

Por outro lado, há outras situações em que a velocidade de propagação do fenômeno torna-se menor como no envelhecimento (GUEDES et al., 1996), hiperglicemia (COSTA-CRUZ et al., 2006; XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991), a facilitação da atividade serotoninérgica (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; GUEDES et al., 2002), o uso de anestésicos (GUEDES & BARRETO, 1992) e a estimulação elétrica periférica (DO MONTE-SILVA et al., 2007).

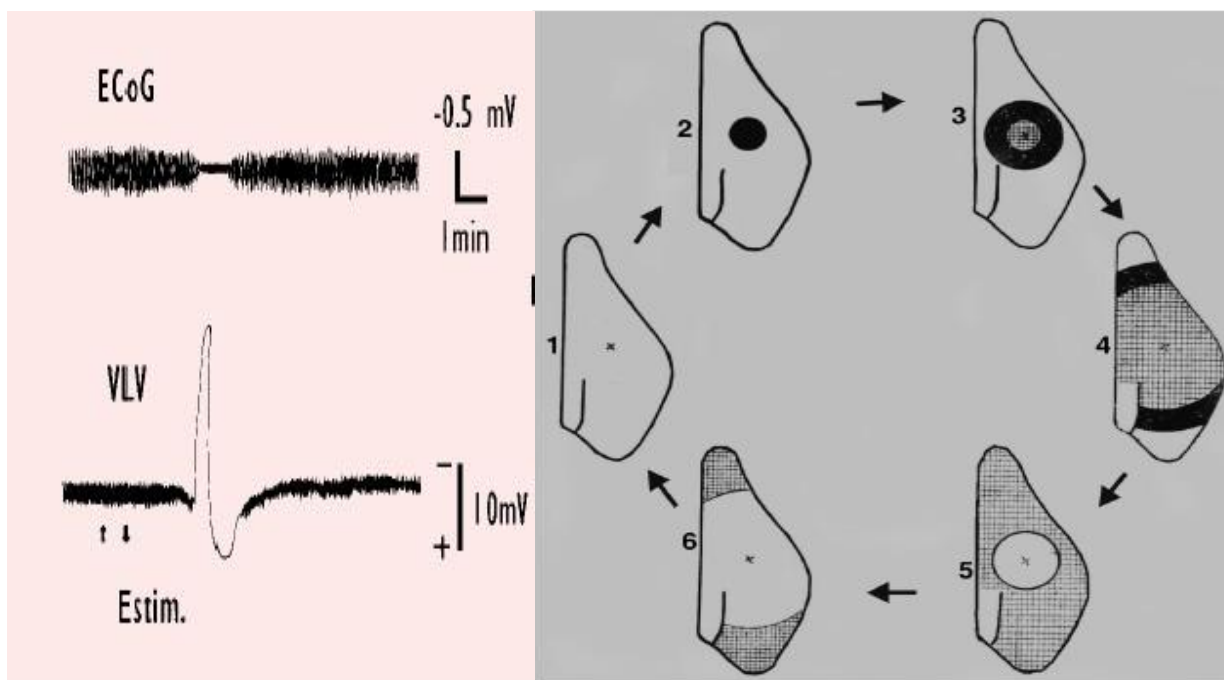


Figura 1- À direita, esquema ilustrando a seqüência de eventos (numerados de 1 a 6) que ocorrem durante a depressão alastrante cortical (DAC) da atividade elétrica, no córtex cerebral de um coelho anestesiado (esquema adaptado de uma ilustração original do professor Hiss Martins-Ferreira). No momento 1, um ponto cortical (X) foi estimulado, iniciando a DAC. A sua propagação, concêntrica, está ilustrada nas etapas de 2 a 4, nas quais as áreas escuras representam porções do tecido cortical invadidas pela DAC e as áreas quadriculadas indicam regiões que já sofreram a DAC e agora estão se recuperando do fenômeno (áreas refratárias a uma nova estimulação). Nas etapas 5 e 6 observa-se que a recuperação também se dá de forma concêntrica, sendo o ponto onde a DAC se originou o primeiro a se recuperar totalmente (áreas claras). Finalmente, todo o tecido se recupera, retornando à condição inicial (etapa 1). À esquerda, mostram-se o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV), registrados simultaneamente em um ponto cortical, durante a DAC (registro obtido em nosso laboratório). Esta foi deflagrada pela estimulação química (KCl a 2%), aplicada, durante 1 min, a um ponto cortical situado a cerca de 8 mm do local do registro, no período assinalado pelas setas (Estim.). Nota-se, no ECoG, a redução da amplitude das ondas eletrográficas, no momento em que ocorre a VLV, característica da DAC. A depressão do ECoG recupera-se totalmente após cerca de 3 minutos (Adaptado de GUEDES, 2005).

A atividade elétrica cortical epileptiforme associada à DAC, mostra 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, à luz das evidências apresentadas a seguir.

2.3 Depressão alastrante e “potenciação de longa duração” (LTP)

A LTP corresponde a um aumento de respostas pós-sinápticas, aumento este que pode durar horas, dias ou semanas após a breve estimulação repetitiva de aferentes pré-

sinápticos. Ou seja, é um aumento persistente na intensidade sináptica (plasticidade neuronal) associado com aprendizagem e memória (IZQUIERDO, 2008).

A LTP no hipocampo tem sido reconhecida como um modelo muito utilizado em estudos de plasticidade sináptica no cérebro de mamíferos. Apesar dos progressos realizados, para elucidar seus mecanismos de indução e expressão, os fatores responsáveis pelo aumento prolongado da eficácia sináptica ainda permanecem por serem desvendados (ANWYL, 2009).

Esse realce da eficácia sináptica 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 desencadeia a DAC (GHADIRI et al., 2009; WERNSMANN et al., 2006).

A LTP envolve três propriedades básicas. A primeira é a **cooperatividade**, que pode ser explicada pelo fato de que para provocar a LTP a célula pós-sináptica deve ser despolarizada para permitir que a corrente de Ca^{2+} flua através do receptor de NMDA. Isto é, ao usar um aumento da frequência da estimulação para induzir a LTP, um número crucial de fibras pré-sinápticas deve ser simultaneamente ativado – devem cooperar para elicitar a LTP. A segunda propriedade, a **especificidade** é explicada pela exigência de que para elicitar a LTP os receptores sinápticos de NMDA, que são susceptíveis à ação do Glu, devem ser ativados, conduzindo a um aumento de Ca^{2+} intracelular nas espinhas dendríticas. A última propriedade refere-se à **associatividade**, que pode ser explicada pelo fato de que o estímulo que vai induzir a LTP fornece a despolarização necessária, a qual é rapidamente transmitida através da árvore dendrítica àquelas sinapses em que os receptores de NMDA estavam ativados e assim a LTP pode ser também elicitada em sinapses ativadas com baixa frequência (MALENKA, 2003).

Muitas proteínas são sintetizadas na região CA1 do hipocampo após a LTP, e resultam da ativação precoce de uma variedade de glico e sialoglicoproteínas (FOLEY et al., 2003). Estas são responsáveis por moldar as mudanças morfológicas nos terminais dendríticos e/ou terminais do axônio que fazem sinapses com elas (FOLEY, et al., 2003; ROSE, 1995). Tais mudanças foram sugeridas como a base da manutenção da LTP e memória (BOZON et al., 2003; KANDEL & SQUIRE, 2000; LYNCH et al., 2007). Todas essas mudanças sugerem um realce na eficácia sináptica. Assim, a manutenção da LTP na região CA1 do hipocampo parece resultar de uma sequência organizada de eventos moleculares iniciados pela ativação do receptor de N-metil-D-

aspartato (NMDA) e culmina em mudanças morfológicas nas sinapses na região CA1 (IZQUIERDO, 2008) (Figura 2).

A LTP foi observada inicialmente no hipocampo e continua a ser estudada mais facilmente nessa região do cérebro que está envolvida com aprendizagem e memória (MALENKA, 2003). Entretanto, este fenômeno pode ser também observado em outras regiões como no neocórtex. FOOTITT & 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, pela primeira vez, a ocorrência deste fenômeno “*in vivo*” no teto óptico de vertebrado não-mamífero (rã).

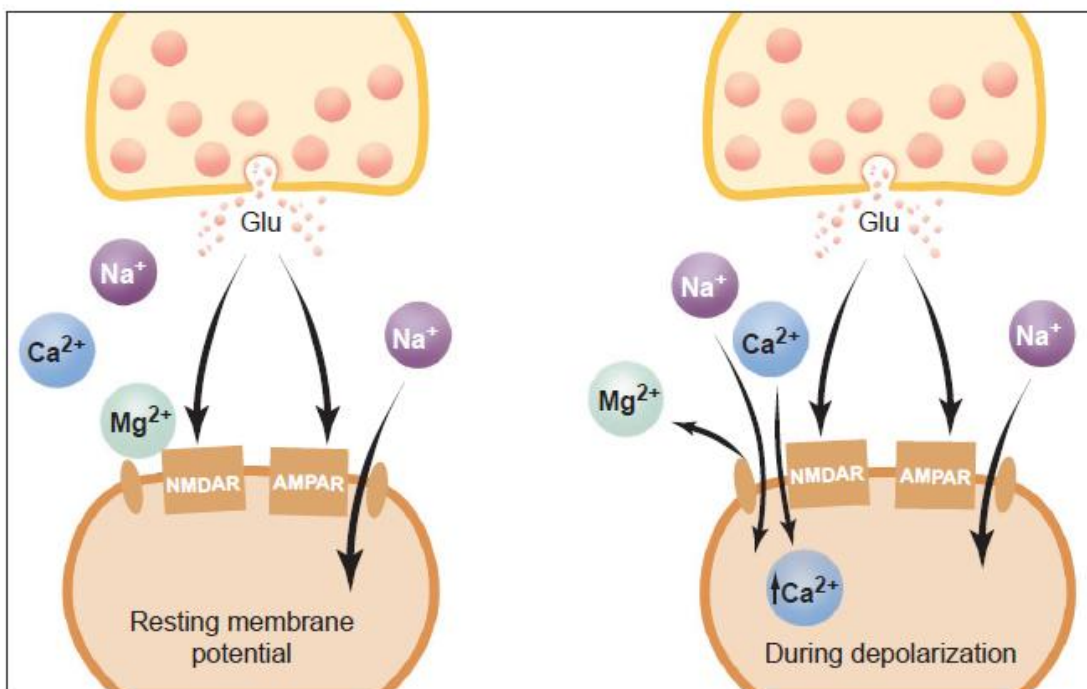


Figura 2 – Modelo de indução da LTP. Durante a transmissão sináptica normal, glutamato (Glu) é liberado a partir do botão pré-sináptico e atua sobre os receptores AMPA (AMPA) e NMDA (NMDARs). No entanto, somente o Na^+ flui através dos receptores de AMPA, mas não nos receptores de NMDA, porque o Mg^{2+} bloqueia o canal dos receptores de NMDA. Despolarização da célula pós-sináptica diminui o bloqueio do Mg^{2+} nos receptores NMDA, permitindo o fluxo de Na^+ e Ca^{2+} para a espinha dendrítica, por meio do receptor de NMDA. O aumento de Ca^{2+} nas espinhas dendríticas é o disparo da LTP (Adaptado de MALENKA & NICOLL, 1999).

Além do NMDA, outro subtipo de receptor do glutamato (Glu) também está envolvido com a transmissão sináptica. Trata-se do receptor tipo AMPA, que tem esse nome pela afinidade para com o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA). Este receptor é permeável apenas a cátions monovalentes (Na^+ e K^+). O receptor do tipo NMDA é permeável ao Ca^{2+} , mas é bloqueado por concentrações

fisiológicas de Mg^{2+} . Assim, durante a transmissão sináptica de baixa frequência, o Glu liga-se a ambos os receptores, AMPA e NMDA. Caso o neurônio pós-sináptico esteja em seu potencial de membrana de repouso, estará bloqueado pelo Mg^{2+} e não haverá fluxo de corrente. Quando a célula pós-sináptica estiver despolarizada, o Mg^{2+} é expelido do canal do receptor de NMDA, permitindo o fluxo de Ca^{2+} para dentro dos neurônios pós-sinápticos. Esse aumento de Ca^{2+} nos terminais pós-sinápticos é o fator crítico para o disparo da LTP (MALENKA & NICOLL, 1999; PURVES et al., 2005).

Os mecanismos da LTP não são idênticos em todos os lugares. No córtex, a LTP tem se mostrado dependente da entrada de cálcio pela ativação de receptores do tipo NMDA (BEAR & KIRKWOORD, 1993), já na região CA3 do hipocampo essa exigência não é requerida (IZQUIERDO, 2008). A DAC por si só induz despolarização prolongada, ativação dos canais de NMDA, elevação de cálcio intracelular e potássio extracelular (SOMJEN, 2001). Assim, FOOTITT & NEWBERRY (1998) não se surpreenderam pelo fato da DAC ter induzido uma potenciação semelhante à LTP *in vitro*. É interessante mencionar também que, recentemente, foi descrito um aumento da atividade epileptiforme, associado à DAC, em tecido cortical humano, *in vitro* (GORJI & SPECKMANN, 2004). Nesse contexto, o presente trabalho pretende contribuir para o estudo *in vivo* das relações entre a DAC e fenômenos de potenciação da atividade elétrica cerebral, de natureza semelhante à LTP.

3.0 HIPÓTESES

Nós hipotetizamos que:

- (1) há uma associação causal entre a DAC e a potenciação da atividade elétrica cortical espontânea e evocada, que pode ser demonstrada *in vivo* em ratos pela análise das amplitudes dessas atividades elétricas;
- (2) essa potenciação é influenciada pela desnutrição precoce, de forma duradoura, podendo ser evidenciada mesmo depois do animal se tornar adulto.

4.0 - MÉTODOS

4.1 Animais

Foram estudados ratos machos, da linhagem Wistar (N=42), provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esses animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em ambientes com condições padronizadas de iluminação (ciclo claro/escuro 12/12 horas; fase clara com início às 7:00 horas) e temperatura em torno de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

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 experimentos tiveram início após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº23076.006249/2004-82 – ANEXO B).

Vinte e sete desses animais constituíram três grupos experimentais, conforme a condição nutricional, descrita a seguir:

1- Grupo nutrido (N; n=10), alimentado sempre com a dieta de manutenção do biotério, com 23% de proteína (“Labina”, da Purina do Brasil Ltda –ANEXO C). Essas ninhadas tiveram seus tamanhos uniformizados em seis filhotes.

2- Grupo desnutrido (D; n=10), no qual o estado nutricional dos filhotes lactentes foi alterado aumentando-se o tamanho das ninhadas para doze filhotes, como descrito anteriormente (FRAZÃO et al., 2008; ROCHA DE MELO et al., 2006; TONKISS et al., 1988).

3- Grupo com restrição alimentar na idade adulta (RA; n=7), no qual os animais aos 70 dias de idade foram submetidos à restrição quantitativa da dieta de manutenção do biotério (receberam diariamente, durante 21 dias, 70% da quantidade consumida por ratos normonutridos da mesma idade) (RICH et al., 2010; WOLFF et al., 1999).

Um grupo controle de animais bem-nutridos (chamado DAC^- ; n=5) foi acrescentado ao estudo para determinar se o tempo de registro poderia influenciar as mudanças de amplitudes do ECoG. Neste grupo, a DAC não foi deflagrada durante o registro.

Nestes 32 animais foi avaliada a atividade elétrica espontânea. Em outros dez animais, bem-nutridos (n=5) e desnutridos (n=5), foi avaliada a resposta elétrica evocada (respectivamente grupos NE e DE; ver Figura 3).

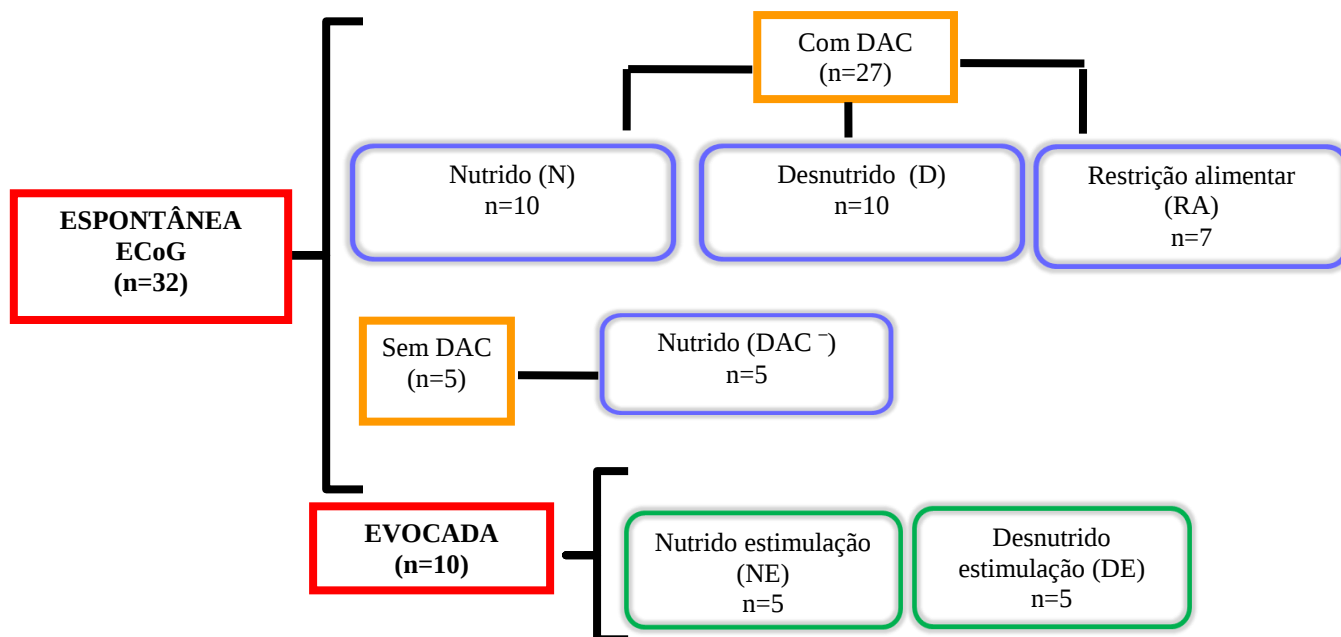


Figura 3. Descrição dos grupos estudados, com o número de animais entre parênteses. DAC=depressão alastrante cortical; N=nutrido; D=desnutrido; RA=restrição alimentar. NE e DE são os grupos de ratos nutridos e desnutridos nos quais se registrou a atividade evocada por estimulação elétrica trans-calosa.

4.2 Pesos Corporais

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), a cada 7 dias durante os períodos de restrição nutricional, sendo o grupo nutrido pesado também nas mesmas idades, para comparação.

4.3 Procedimento cirúrgico e Registro eletrofisiológico

Para realização dos registros eletrofisiológicos, os animais foram anestesiados com uma solução de Uretana a 10% + Cloralose a 0,4%, sendo administrada por via intraperitoneal, em um volume de 1ml do anestésico por 100g de peso corpóreo (equivalente à dose de 1g/Kg de uretana + 40mg/Kg de cloralose)

A cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico, permitindo a incisão da pele, remoção do periósteo para exposição do crânio e a trepanação de três

orifícios de 2-3 mm de diâmetro no hemisfério cerebral direito. O primeiro foi situado no osso frontal, para estimulação com cloreto de potássio (KCl), necessário para deflagrar a DAC, e os outros dois situados no osso parietal (para registrar a DAC). Todos foram alinhados paralelamente à linha média.

Foi utilizado um polígrafo MODELO 7 D (Grass Medical Instruments) para realização dos registros. Durante todo o registro o animal foi mantido sobre um aquecedor elétrico a fim de que a temperatura retal se mantivesse estável, sendo ajustada quando necessário. Em dois pontos da superfície do córtex parietal, foi registrada a atividade elétrica cortical espontânea (eletrocorticograma – ECoG), por um período contínuo de quatro horas. Foram utilizados três eletrodos, sendo um de referência, colocado no osso nasal, e os outros dois de registro. Todos os eletrodos foram do tipo “prata-cloreto de prata”, obtidos por eletrólise. Após serem cloretados, os fios de prata (3 cm de comprimento) foram imersos em pipetas de polietileno (com pontas de 0,5 mm de diâmetro interno), preenchidas com solução de Agar Ringer à 0,5%. Um par dessas pipetas foi colocado em contato com a superfície cortical, para o registro do ECoG; um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre os ossos nasais e usado como eletrodo de referência comum.

Nos grupos N, D e RA as duas primeiras horas do registro transcorreram sem que a DAC fosse deflagrada (não foi realizada estimulação com KCl). Nas duas últimas horas do registro, a DAC passou a ser provocada pela estimulação com KCl, a intervalos de 20 minutos. No grupo DAC^- todas as 4 horas do registro transcorreram sem que a DAC fosse deflagrada uma única vez. As amplitudes do ECoG nas duas horas iniciais do registro foram comparadas com aquelas das duas horas finais, como base para analisar a ocorrência da potenciação da atividade elétrica espontânea associada à presença da DAC. Em todos os casos, o ganho dos amplificadores do polígrafo foi mantido constante durante todo o registro.

4.4 Estimulação cortical

Quando a DAC foi deflagrada, ela o foi em intervalos de 20 minutos, através de estimulação química, por meio de uma pelota de algodão de 1 a 2 mm de diâmetro embebida com uma solução de KCl a 2% (aproximadamente 270 mM). Esta foi

colocada no orifício de estimulação, permanecendo em contato com a superfície cortical durante um minuto. Ao final deste tempo, o estímulo foi retirado e a região enxugada com algodão para remover o KCl.

Nos animais em que se procedeu a análise das respostas corticais evocadas, um eletrodo metálico bipolar concêntrico (1mm de distância entre as extremidades) foi posicionado no córtex parietal esquerdo (1mm de profundidade). Através deste eletrodo, aplicou-se pulsos de 2 V; 0,3 ms, 0,5 Hz. O registro foi realizado por meio de uma micropipeta de vidro (10mm de diâmetro) preenchida com NaCl 2M, sendo esta inserida na região homóloga do córtex direito, a fim de registrar a presença de respostas evocadas pela estimulação elétrica contralateral.

4.5 Digitalização do ECoG e análise dos dados

Esta etapa da análise dos dados ocorreu por meio de uma colaboração científica firmada entre o Departamento de Nutrição - Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio e o Departamento de Eletrônica e Sistemas, contando com a colaboração do Professor Doutor Hélio Magalhães de Oliveira e do Aluno de doutorado em Engenharia elétrica André Ricardson Gomes.

O sinal emitido pelo ECoG possui componentes de diferentes frequências que podem ser transformados de sua forma analógica (contínua; registro em papel) para uma forma digital (discreta). Uma vez que o sinal seja convertido para sua forma digital, torna-se possível a extração de vetores, correspondentes a cada ponto do sinal (ECoG), o que por sua vez permite que o sinal, expresso em uma sequência de vetores, seja submetido à análise através de ferramentas matemáticas aplicáveis. Uma possível operação seria o cálculo da sua *Transformada Discreta de Fourier* (TDF) (TAKAHASHI, 2002) e posterior análise de suas componentes frequenciais. Isto foi realizado neste trabalho. O algoritmo para processamento da imagem digitalizada foi implementado no *software* MATLABTM correspondendo à binarização da imagem, filtragem de ruído do tipo “sal e pimenta” (*Salt and pepper filtering*), conversão de *pixels* para vetores e filtragem frequencial do sinal.

A digitalização foi realizada em amostras, de aproximadamente 10 minutos, do registro eletrofisiológico em papel, colhidas em quatro pontos temporais,

correspondentes a cada uma das 4 horas do registro. Todos os registros foram digitalizados em um *scanner* da marca HP “scanjet-4890”, com uma resolução de 300 pontos por polegada (dpi), o que permite (conforme observações de resultados) identificação satisfatória dos detalhes das imagens (Figura 4).

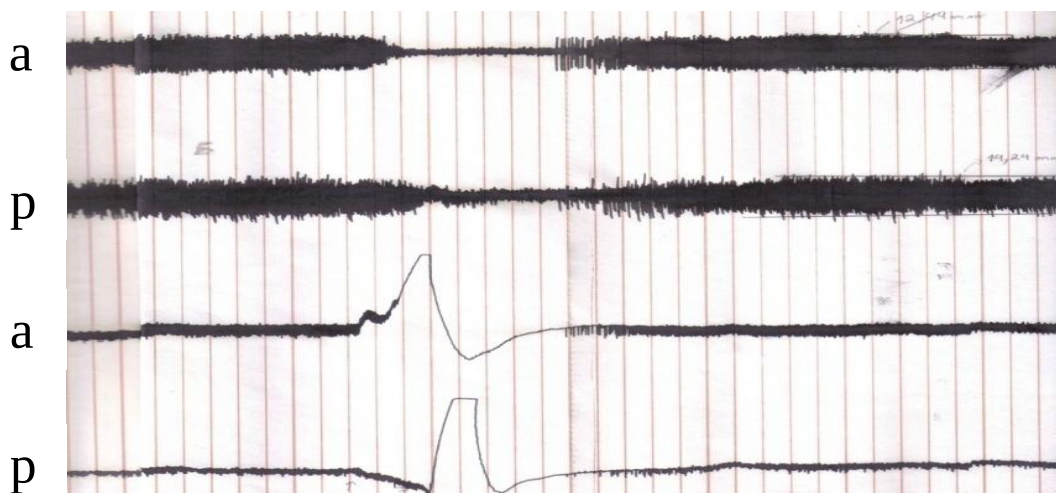


Figura 4 – Registro eletrofisiológico com inscrição em papel. Os dois traçados superiores referem-se ao eletrocorticograma (ECoG), sendo “a” o ponto cortical de registro mais anterior (mais próximo do ponto de estimulação) e “p” o ponto cortical mais posterior. Os traçados inferiores correspondem à variação lenta de voltagem (VLV), que acompanha a Depressão Alastrante Cortical (DAC).

Após a aquisição das imagens em formato digital procedeu-se com a binarização. Este processo de conversão da imagem colorida em binária, além de simplificar a análise, permite um ganho em termos de armazenamento de informação (Figura 5). O posicionamento do papel no *scanner*, durante o processo de digitalização, pode promover inclinação do gráfico (sinal) impresso, introduzindo ruído adicional, o que torna esta etapa bastante importante. A filtragem do ruído do tipo “sal e pimenta” (“*Salt and pepper filtering*”) foi aplicada com o intuito de evitar uma falsa identificação nos pontos de análise, extraindo os pixels isolados, pontos brancos – *salt* e pontos pretos – *pepper* que podem aparecer no processo de digitalização (Figura 6).



Figura 5 – Representação de parte do registro eletrofisiológico. É possível observar a remoção das linhas de grade do registro, com a imagem binarizada.

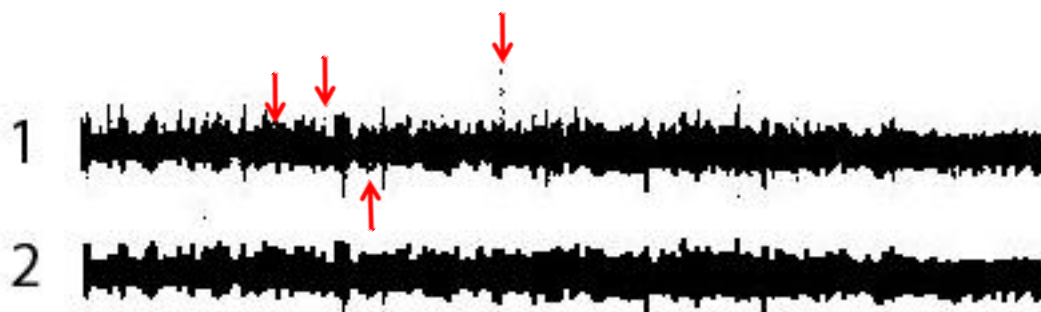


Figura 6 – Representação de um trecho do registro eletrofisiológico digitalizado antes (1) e depois (2) de filtragem para eliminar interferências ou ruídos. Em 1, tem-se a imagem não filtrada, em que é possível observar a existência dos pontos brancos e pretos (setas), que constituem o chamado “ruído do tipo sal e pimenta” (“*Salt and pepper noise*”). Em 2 tem-se o mesmo registro após a remoção dos pontos brancos – *salt* e pontos pretos – *pepper*.

Para uma recuperação representativa dos dados da imagem, dois vetores foram extraídos a partir da imagem binarizada para cada coluna de pixels, representando a espessura do traçado do sinal. O algoritmo procura os dados desde o primeiro pixel (inferior-esquerdo) até o último (superior-direito). Esses vetores formam as envoltórias do sinal. A diferença média entre os vetores determina a variação de amplitude do ECoG (Figura 7). Como os valores das distâncias não podem ser expressos em pixels, visto este não ser uma unidade de medida, posteriormente procedeu-se a etapa de normalização dos dados, normalização esta realizada em relação ao menor valor das amplitudes, ao qual se atribuiu o valor unitário.

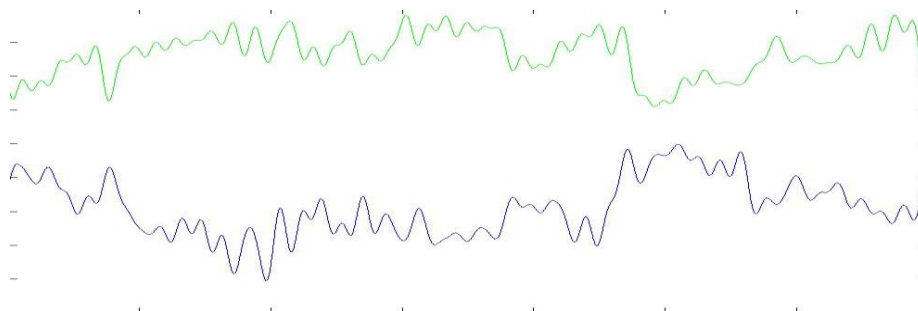


Figura 7 – Representação dos vetores que formam as envoltórias em torno do traçado eletrocorticográfico (ECoG), mostrado na Figura 4. A diferença média entre eles estabelece a variação de amplitude do ECoG. A linha verde representa o limite superior do registro e a linha azul o seu limite inferior.

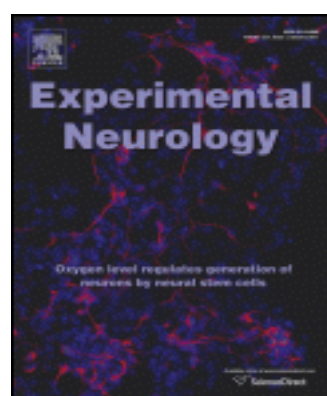
Os dados adquiridos através de uma conversão A/D ainda possuem componentes de altas frequências, tornando difícil de modelar matematicamente o sinal. O procedimento adotado foi a utilização da TDF para adquirir a resposta no domínio de frequência adequado. Em seguida, aplicou-se uma janela retangular para filtrar os componentes de altas frequências. Como o interesse foi analisar a amplitude média dos sinais do ECoG, utilizou-se apenas a componente DC do sinal, uma vez que esta expressa o valor médio em torno do qual o sinal apresenta variações.

Para cada animal, os valores das amplitudes nas 4 amostras do registro foram normalizados e expressos em unidades relativas. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do Teste T pareado de Student, sendo aceito como significantes as diferenças em que $p < 0,05$.

5.0 RESULTADOS – Artigo Original

Increased cortical excitability after spreading depression in well-nourished and malnourished rats: in vivo spontaneous and evoked potential analysis.

Artigo submetido para publicação na Revista Experimental Neurology



Title:

Increased cortical excitability after spreading depression in well-nourished and malnourished rats: in vivo spontaneous and evoked potential analysis.

Authors:

Thays Kallyne Marinho de Souza¹, Mariana Barros e Silva¹, André Ricardson Gomes², Hélio Magalhães de Oliveira², Renato Barros Moraes¹, Catão Temístocles de Freitas Barbosa³, Rubem Carlos Araújo Guedes^{1CA}.

Affiliations:

1. Dept. of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife Pernambuco, Brazil.

2. Dept. of Systems Electronics, Universidade Federal Pernambuco, 50711970, Recife, Pernambuco, Brazil.

3. Univ. Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

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

Phone: +55- 81-21268936; FAX: +55-81-21268473; email: rc.guedes@terra.com.br

ABSTRACT

Cortical spreading depression (CSD) is influenced by neural excitability and seems to potentiate brain electrical activity, which may be relevant for human excitability-related neurological diseases, such as epilepsy. Herein we investigated *in vivo* whether CSD potentiates the amplitude of electrocorticogram (ECoG) and of electrically evoked responses in adult well-nourished (W), early-malnourished (M) and food-restricted (FR) rats. Under anesthesia, a baseline ECoG was recorded during 2h and after that, CSD was elicited every 20min for 2 additional hours. ECoG amplitudes recorded before and after CSD were compared at two parietal regions: anterior (**a**) and posterior (**p**). In point **a**, the post-CSD ECoG amplitudes were 13-23% higher ($p < 0.05$) than the baseline values in the three nutritional groups. In point **p**, the amplitudes increased 22% only in the M group ($p < 0.05$). A fourth CSD-free W-control group did not present ECoG amplitude change along the four recording hours. Transcallosal electrically evoked cortical responses also presented a post-CSD 20% and 40% amplitude increases in the W- and M-rats, respectively. Data support the hypothesis of an *in vivo* CSD potentiating effect on the cortical excitability as recorded by spontaneous (ECoG) and evoked electrical activity, and modulation by the nutritional status. Possible physiological implications of this CSD induced change remains to be investigated.

Keywords: Cortical spreading depression, Malnutrition, Brain excitability, Long-term potentiation.

INTRODUCTION

Cortical spreading depression (CSD) was experimentally described as a reversible and propagated wave of reduction of the spontaneous and evoked electrical activity of the cerebral cortex (Leão, 1944). This phenomenon occurs in response to the electrical, chemical, or mechanical stimulation of one point of the cortical surface. Simultaneously to the EEG depression, a slow potential change (also called DC potential change) of the tissue has been described (Leão, 1947).

CSD intrinsic mechanisms and its possible relations with brain diseases have not yet been fully achieved, but experimental evidence suggests strong connections between CSD and excitability-related human neurological diseases like epilepsy, migraine, and brain ischemia (Hadjikhani, et al. 2001, Guedes, 2005, Goadsby, 2006; Moskowitz, 2007; Berger, et al., 2008;). The appearance of abnormal, epileptiform EEG-waves associated with CSD (Leão, 1944; Guedes and Do Carmo, 1980) led to the postulation of a CSD-related modulation in neural excitability and synaptic activity, with a possible implication for long-term potentiation (Footit and Newberry, 1998).

LTP is characterized as an increase in postsynaptic responses that can last hours, days or weeks after brief repetitive stimulation of pre synaptic afferents. The phenomenon appears to occur as a consequence of a persistent increase in synaptic strength (neural plasticity), which has been associated with learning and memory e.g. (Izquierdo et al., 2008). LTP has been largely investigated in the mammalian hippocampus in studies of synaptic plasticity and neuronal excitability. Despite many progresses in the efforts to elucidate the mechanisms of induction and expression of LTP, the factors responsible for the prolonged increase in synaptic efficacy during the phenomenon remain to be

fully explained (Anwyl, 2009). In addition there has not been investigated so far any possible relationship between CSD and LTP in vivo in the mammalian brain.

In a previous report we have investigated the effects of nutritional early changes on the speed of CSD propagation at adulthood (Rocha-de-Melo et al., 2006), however, no previous report investigated possible changes induced by malnutrition in CSD-related cortical activity amplitude. Since it is already known that alterations in anatomical, biochemical and electrophysiological parameters of the brain can be caused by changes of the nutritional status of developing organisms (Barret and Radke-Yarrow, 1985; Hack et al., 1991; Strupp and Levitsky, 1995, Picanço-Diniz et al., 1998; Ranade et al., 2008) we aimed to investigate the effects of early malnutrition on the cortical excitability as recorded by electrocorticography, as well as on transcallosal electrically driven evoked activities recorded by glass micropipettes in adult rats submitted to CSD. Subjects were previously submitted to nutritional changes during weaning period, or to an acute period of 21 days of food restriction at adulthood. We hypothesized (1) that there is a causal association between CSD and the potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity; (2) that this potentiation is influenced by the early nutritional status of the adult animal but not by a short period of food restriction at adulthood (Morgane et al., 2002; Guedes, 2005).

METHODS

Animals and nutritional treatments

The 42 male Wistar rats of this study were handled in accordance with the protocols of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco, which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA). They were kept in polypropylene cages (51 cm×35.5 cm×18.5

cm) in a room maintained at $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). Post-CSD potentiation was evaluated in 32 rats for the spontaneous (ECoG) activity and in 10 rats for the transcallosal electrically driven cortical evoked responses. The 32 animals in the ECoG-study were distributed into three groups well-nourished (W, $n = 15$), malnourished (M, $n = 10$) and food-restricted (FR, $n = 7$) according to the nutritional status. Groups W and M were suckled in litters formed by 6 and 12 pups, respectively (Plagemann et al, 1999). Increasing the number of pups per litter has been proven to be effective in engendering a moderate degree of malnutrition during the lactation period (Rocha de Melo et al., 2006; Frazão et al., 2008). Group FR was formed by W-rats subjected during 21 days (from postnatal day 70 to 90) to quantitative restriction of laboratory chow diet. These animals received 70% of the amount of diet consumed by age-mated well-nourished rats, as previously described (Wolff et al., 1999; Rich et al., 2010). All subjects were suckled by dams fed a laboratory chow diet (Purina do Brazil Ltda), with 23% protein. The W and M groups were weighed on postnatal days 7, 14, 21, 30, 60 and 90. The FR group was weighed at 90 days.

Electrophysiological recordings

On the day of the electrophysiological recording, 90 – 120 days old rats were anesthetized by i.p. injecting a mixture of 1,000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (Sigma; 10 ml/kg). For the spontaneous activity recording (electrocorticogram; ECoG), three trephine holes were drilled on the right side of the skull. These holes were aligned in the frontal-occipital direction and parallel to the midline. CSD was elicited at 20 min intervals by 1 min application of a cotton ball (1–2 mm diameter), soaked with 2% KCl solution, to the anterior hole (2 mm diameter) drilled at the frontal region. The two other holes (2–3 mm diameter) on the parietal-

occipital region served as recording places, called respectively “**a**” (anterior) and “**p**” (posterior) recording points. The ECoG and the DC-potential of the cortical surface were continuously recorded for 4 h, by means of two Ag–AgCl agar-Ringer electrodes (one in each hole), against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bone.

During the two initial recording hours, no KCl stimulus was applied and consequently no CSD was elicited (baseline period). In 27 animals of the ECoG study (10 W, 10M and 7FR rats), six CSD episodes were elicited in the last two recording hours, by 1-min cortical stimulation with 2% KCl at 20 min intervals (CSD period). In each animal, we compared the amplitudes of ECoG before and after starting to elicit CSD as the basis for assessing the occurrence of potentiating of spontaneous electrical activity. For each recording amplifier, the gain was kept constant along the record. The remaining 5 W rats of the ECoG study constituted one additional control group, designated as CSD[−]. This control group consisted of rats in which CSD was not elicited at all, and served to check whether the time of recording could have any influence in changing the ECoG amplitudes. During the recording period, rectal temperature was maintained at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ by means of a heating pad.

The ECoG and the slow potential changes of CSD were amplified by connecting the electrodes to GRASS DC-amplifiers, and the ECoG was recorded with AC-amplification (band pass filters set at 1 to 35 Hz range). The recordings were performed in a model 7-D GRASS chart recorder. From each animal, four ECoG-samples of about 10 minutes of the ink-writer recordings were scanned on a HP scanner (model Scanjet-4890) with a resolution of 300 dpi. Two of those samples were taken during the baseline period (before CSD) and the further two samples came from the “CSD period”. The algorithm for processing the images was implemented in software MATLABTM

corresponding to an image binarization, a salt-and-pepper- like noise filtering, a pixel to vector conversion and a high-frequency signal filtering (Bruce, 2000). Following that, two vectors were extracted from the binarized ECoG image for each column of pixels, representing the amplitude of the signal. The algorithm for vector extraction searches the data from the first pixel (bottom-left) to the last one (top-right). These vectors form the envelopes of the ECoG activity and the mean difference between them determines the amplitude variation of the ECoG. The pixels values, before and after CSD, were then normalized, assigning a unitary value to the lowest amplitude.

For the recording of the transcallosal cortical evoked responses, 5 W- and 5 M-rats were studied. In these animals, a metallic bipolar concentric stimulating electrode (1 mm distance separating the tips) was positioned in the left parietal cortex (1 mm deep). Through this electrode, stimulating pulses (2 V; 0.3 ms; 0.5 Hz) were applied. A Borosilicate glass recording micropipette (10 μ m tip diameter) filled with 2M NaCl was inserted in the homologous region of the right cortex, in order to record the field potential responses, evoked by the contralateral electrical stimulation. In each animal, the post-CSD amplitudes were compared to those of the pre-CSD period.

At the end of the recording session, the still anesthetized animals were subjected to euthanasia by bulbar injury (provoked by introducing a sharp needle into the cisterna magna), with subsequent cardio-respiratory arrest.

The intergroup weight differences were compared by using the T test. Intragroup amplitude differences in the spontaneous and evoked cortical activity, before *versus* after CSD, were analyzed with paired T-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

As shown in figure 1, malnutrition during the suckling period (group M) resulted in lower ($P<0.05$) body weights from postnatal day 14 to 90, with an average weight loss of $27.3\pm4.5\%$ as compared to the well-nourished (W) control group. The food-restricted group (restricted at adulthood during 21 days by receiving only 70% of the daily food consumed by the age-matched controls) also presented a significant ($13.4\pm3.6\%$) weight reduction at the end of the restriction period (at 90 days of age; Fig 1, lower panel).

Figure 1 around here

Fig 2 shows representative electrocorticogram recordings of 4 rats respectively from the W, M, FR and CSD⁻ groups. In the groups submitted to CSD (W, M and FR) an increase in ECoG amplitude can be noted after the CSD episodes begun to be elicited in the final 2-h period of the recording (right column), as compared with the initial (baseline) 2-h period (left column). In the CSD⁻ group, no CSD was elicited and no amplitude increase could be detected.

The quantification of this CSD related potentiation-effect is presented in Fig 3.

Compared to the control recording period (2 initial hours), the ECoG amplitudes in the CSD period (2 final recording hours) increased significantly ($p<0.05$) for the W, M and FR groups at recording point “**a**” (mean increases of respectively 22, 23 and 13%). In point “**p**”, the amplitude increase was significant only in group M (mean increase of 22%). No amplitude difference could be observed along the four recording hours in the CSD-free control group (CSD⁻).

Figures 2 and 3 around here

The transcallosal cortical responses evoked by electrical stimulation also presented post-CSD increases in amplitude, when compared with the pre-CSD values for the same animals. The recordings shown in the upper panels of Figure 4 are examples of these amplitude increases, which on average were 21.5 ± 9.6 and 41.8 ± 28.5 for the W- and M-groups, respectively ($p < 0.01$; lower panel of Figure 4).

Figure 4 around here

DISCUSSION

In this study, we identified *in vivo* CSD-related amplification in the electrophysiological cortical spontaneous and evoked activities in adult rats subjected to different nutritional conditions. Data demonstrate that CSD triggered by application of KCl induced an amplitude-potential of ECoG and transcallosal evoked responses that seem to be modulated by the nutritional status of the animal. To the best of our knowledge, the present data provide the first *in vivo* demonstration of ECoG-amplitude potentiation associated to CSD, in the rat cerebral cortex. The finding that the ECoG activity is potentiated by CSD, and not by the duration of the ECoG recording, is in line with the suggestion that somehow CSD could be related to the LTP phenomenon (Footitt and Newberry, 1998). The underlying mechanisms of this CSD effect will be discussed in light of the evidence supporting this relationship.

It appears that this potentiation effect is similar to those previously reported *in vitro* in rat cortical slices (Footitt and Newberry, 1998), in the rat spinal cord (Gorji et al.,

2004), and *in vivo* in electrically evoked responses in the frog optic tectum (Guedes et al., 2005). We suggest that post-CSD potentiation probably is a general feature of the nervous tissue, involving mechanisms common to brain spontaneous and evoked electrical activity. It is also common to lower vertebrates and mammals, and not a particular characteristic of a particular species. In addition, a similar potentiation response associated with CSD has also been described in human cortical tissue *in vitro* (Gorji and Speckmann, 2004). Since we did not find any potentiation in the CSD-free group (CSD⁻) we suggest that the CSD-induced amplitude enhancement is not an event time elapsed-dependent but a real synaptic change induced by CSD. Thus, our *in vivo* data recordings reinforce the idea of a CSD-induced LTP-like phenomenon. In this context, it is interesting to mention that LTP may also be induced *in vitro* by brief exposure to KCl (Bernard et al., 1994), a stimulus that can also trigger the CSD. The induction of a LTP-like phenomenon by CSD receives support from experimental evidence. Indeed CSD can long-lastingly depolarize neurons and also can activate NMDA channels, with increases in the extracellular potassium and in intracellular calcium (Somjen et al., 1992). Two distinct mechanisms could account for the present CSD effect. First, considering that the action of excitatory amino acids is an important source of brain excitatory influences (Hicks and Conti, 1996), it is reasonable to propose the involvement of NMDA-linked mechanisms on CSD potentiation effect. Second, it is also conceivable that the participation of disinhibition mechanisms, acting on feed forward inhibitory synapses (McMahon and Kauer, 1997), could also be involved. In fact, these two possibilities may act together and this possibility needs further investigation. In line with previous studies (Rocha-de-Melo et al., 2006; Rich et al., 2010), we were effective in inducing malnutrition, as judged by the weight reduction found in the M and FR groups (Fig 1). Nutritional deficiency can contribute to affect

basic neural functions such as processing of sensory information and sensation perception, as well as execution of motor tasks (Barret and Radke-Yarrow, 1985). More elaborated functions such as those involving consciousness, cognition, learning, memory and emotion can also be impaired by malnutrition, and electrophysiological evidence points to excitability-related disturbances (Almeida et al, 2002). As a consequence, the organism may become more susceptible to certain neurological diseases, such as epilepsy (Morgane et al., 1978; Almeida et al., 2002). The recording of evoked and spontaneous brain electrical activity has been previously used to investigate to what extent nutritional disorders affect electrophysiological aspects of the brain (Morgane et al., 1978; Guedes, 2005). Early malnutrition was presently shown to influence the ECoG potentiation associated to CSD, indicating a nutrition-related modulation. This modulation has not been seen in the group submitted to food restriction at adulthood, suggesting a development-dependent action of malnutrition and reflecting plastic modifications of neural function (Cheetham et al., 2007).

The mechanisms by which nutritional deficiency disrupts the brain development and function seem to include processes like dendritic development, synapse formation and myelination (Morgane et al., 1978; Picanço-Diniz et al., 1998). As previously demonstrated, malnutrition can impair gliogenesis and myelin formation and increases brain cell packing density (Morgane et al., 1978). When compared with the normal brain, the early-malnourished brain is smaller. Their cells are also smaller and are packed in a denser manner and with a reduced amount of myelin. Under such conditions, CSD has been shown to be facilitated (Frazão et al., 2008). In nutritionally normal animals, impairment of glial function (Largo et al., 1997) and of myelination (Merkler et al., 2009) also favor CSD propagation, while overnutrition (Rocha-de-Melo et al., 2006) and also hypermyelination (Merkler et al., 2009) impairs it. Malnourished

rats also present an increase in the brain amount of the enzyme glutamic acid decarboxylase (Díaz-Cintra et al., 2007) and a decrease of brain glutamate uptake (Feoli et al., 2006), two conditions that can lead to an increase in extracellular glutamate, which also would facilitate CSD and may have contributed to the post-CSD potentiation of the evoked and spontaneous cortical activity.

Concerning the ECoG effect, our data on the CSD-related potentiation indicated regional differences in the cerebral cortex, with the anterior recording region being more susceptible to the CSD potentiation as compared to the posterior place. Early malnutrition seemed to modify this response pattern, rendering the posterior recording region more susceptible to this effect. Regional response differences in the rat cortex have also been recently described for differential effects of anti-migraine drugs on CSD (Bogdanov et al., 2011), as well as for neurovascular coupling, by employing functional magnetic resonance imaging and electrophysiological recording (Sloan et al, 2010).

Concerning the relevance of our findings for the human brain, it is interesting to consider the recent report, in extremely low birth weight infants, of regional differences in EEG functional connectivity, as compared to term infants (Grieve et al., 2008).

In conclusion, the present *in vivo* study documents a novel electrophysiological action of CSD on the spontaneous and evoked cortical electric activity in well nourished and early malnourished rats, allowing us to draw the following three conclusions: first, after CSD elicitation in the rat cortex the spontaneous and evoked activities increase their amplitudes; second, regarding the ECoG, the parietal anterior region is more susceptible to this CSD-action than the parietal posterior area; third, malnutrition early-in-life enhances this potentiation, suggesting a nutrition-related imbalance between cortical excitation and inhibition mechanisms that modulate brain excitability. Considering that evidence is available relating CSD mechanisms and processes underlying excitability-

related human diseases like epilepsy (Guedes et al., 1992; Guedes and Cavalheiro, 1997) the present data might help in understanding the CSD-brain excitability relationship in the developing brain.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CAPES (Procad/2007), CNPq (No.474126/2010-2), MSSCTIEDECIT (No. 17/2006), Facepe (APQ0975-4.05/08), and IBN-Net/Finep (No. 4191) for financial support. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 301190/2010-0)

REFERENCES

- Almeida, S.S., Duntas, L.H., Dye, L., Nunes, M.L., Prasad, C., Rocha, J.B.T., Wainwright, P., Zaia, C.T.B.V., Guedes, R.C.A., 2002. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr. Neurosci.* 5, 311-320.
- Anwyl, R., 2009. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. *Neuropharmacol.* 56, 735–740.
- Barret, D.E., Radke-Yarrow, M., 1985. Effects of nutritional supplementation on children's responses to novel, frustrating and competitive situations. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 102-120.
- Berger, M., Speckmann, E-J., Pape, H.C., Gorji, A., 2008. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. *Cephalalgia.* 28, 558–562.
- Bernard, J., Lahsaini, A., Massicote, G., 1994. Potassium-induced long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus.* 4, 447–453.
- 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.
- Bruce, E.N., 2000. Biomedical signal processing and signal modeling. John Wiley Profession.

- Cheetham, C.E., Finnerty, G.T., 2007. Plasticity and its role in neurological diseases of the adult nervous system. *Adv. Clin. Neurosci. Rehabil.* 7, 8–9.
- Díaz-Cintra, S., González-Maciel, A., Ángel –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. *Exper. Neurol.* 208, 47–53.
- Feoli, A.M., Siqueira, I., Almeida, L.M.V., 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.
- Footitt, D.R., Newberry, N.R., 1998. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain Res.* 339-342.
- Frazão, M.F., Maia, L.M.S.S., Guedes, R.C.A., 2008. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-arginine facilitating effect on cortical spreading depression. *Neurosci. Lett.* 447, 26-30.
- Goadsby, P.J., 2006. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and Therapeutics. *Trends in Molecular Medicine.* 13, 39-44.

- 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.
- Grieve, P.G., Isler, J.R., Izraelit, A., Peterson, B.S., Fifer, W.P., Myers, M.M., Stark, R.I., 2008. EEG functional connectivity in term age extremely low birth weight infants. *Clin. Neurophysiol.* 119, 2712–2720.
- Guedes, R.C.A., 2005. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience, In: Lieberman, H., Kanarek, R., Prasad, C., (eds), In: *Nutritional neuroscience*, “Nutritional Neuroscience: overview of an emerging field”, New York: CRC Press, pp. 39-44.
- Guedes, R.C.A., Cabral-Filho, J.E., Teodósio, N.R., 1992. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats, In: Do Carmo, R.J., (ed.), *Spreading Depression*, Springer, Berlin, *Exp. Brain Res. Series*, 23, pp.17-26.
- Guedes, R.C.A., Cavalheiro, E.A., 1997. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Res.* 27, 33-40.

- Guedes, R.C.A., Do Carmo, R.J., 1980. Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Exp. Brain Res.* 39, 341-349.
- 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.
- Hack, M., Breslau, N., Weissman, B., Aram, D., Klein, N., Borawski, E., 1991. Effects of very birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *New Engl. J. Med.* 325, 321-327.
- Hadjikhani, N., del Rio, M.S., Wu, O., Schwartz, D., Bakker, D., Fischl, B., Kwong, K.K., Cutrer, F.M., Rosen, B.R., Tootell, R.B.H., G.Sorensen, A., Moskowitz, M.A., 2001. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Neurobiol.* 98, 4687–4692.
- Hicks, T.P., Conti, F., 1996. Amino acids as the source of considerable excitation in cerebral cortex *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 341– 361.
- Izquierdo, I., Cammarota, M., Da Silva, W.C., Lia, R.M., Bevilacqua¹, Rossato, J. I., Bonini, J.S., Mello, P., Benetti, F., Costa, J.N.C., Medina, J.H., 2008. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 80, 115-127.

- Largo, C., Ibarz, J.M., Herreras, O., 1997. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J. Neurophysiol.* 78, 295–307.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex *J. Neurophysiol.* 7, 359-390.
- Leão, A.A.P., 1947. The slow voltage variation of spreading depression of activity *J. Neurophysiol.* 10, 409-414.
- McMahon, L.L., Kauer, J.A., 1997. Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity. *Neuron.* 18, 295–305.
- Merkler, D., Klinker, F., Jürgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B.G., Sereda, M., Guedes, R.C.A., Brück, W., Liebetanz, D., 2009. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.* 66, 355–365.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E., Resnick, O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2, 137-230.
- Morgane, P.J., Mokler, D.J., Galler, J.R., 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 471-483.

Moskowitz, M.A., 2007. Pathophysiology of Headache—Past and Present. *Headache*. 47, 58-63.

Picanço-Diniz, C.W., Araújo, M.S., Borba, J.M.C., Guedes, R.C.A., 1998. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr. Neurosci.* 1, 35–48.

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Waas, T., Melchior, K., Ziska, T., Rohde, W., Dorner, G., 1999. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J. Neuroendocrinol.* 11, 541–546.

Ranade, S.C., Rose, A., Rao, M., Gallego, J., Gressens, P., Mani, S., 2008. Many different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. *Neurosci.* 152, 859-866.

Rich, N.J., Van Landingham, J.W., Figueiroa, S., Seth, R., Corniola, R.S., Levenson, C.W., 2010. Chronic caloric restriction reduces tissue damage and improves spatial memory in a rat model of traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* 88, 2933-2939.

Rocha-de-Melo, A.P., Cavalcanti, J.B., Barros, A.S., Guedes, R.C.A., 2006. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9, 155-160.

- Sloan, H.L., Austin, V.C., Blamire, A.M., Schnupp, J.W.H., Lowe, A.S., Allers, K.A., Matthews, P.M., Sibson, N.R., 2010. Regional differences in neurovascular coupling in rat brain as determined by fMRI and electrophysiology. *NeuroImage* 53, 399–411.
- Somjen, G.G., Aitken, P.G., Czeh, G.L., Herrera, O., Jing, J., Young, J.N., 1992. Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, 248–254.
- Strupp, B.J., Levitsky, D.A., 1995. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *J. Nutr.* 125, 2221-2232.
- Wolff, G.L., Kodell, R.L., Kaput, J.A., 1999. Caloric restriction abolishes enhanced metabolic efficiency induced by ectopic agouti protein in yellow mice. *Proc Soc Exp. Biol. Med.* 221, 99-104.

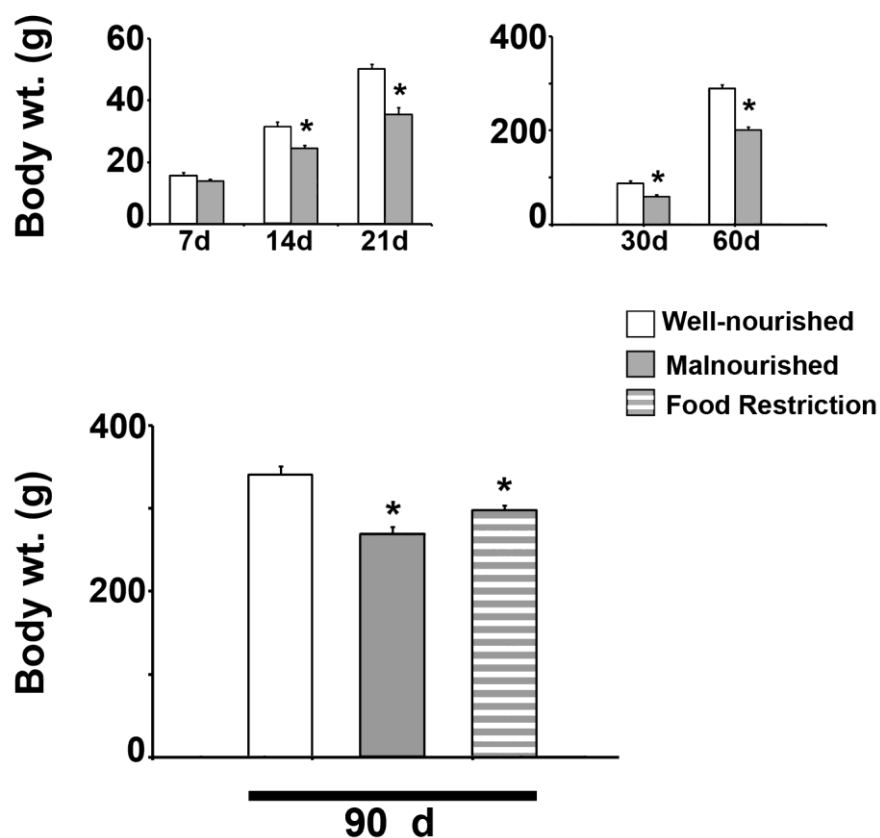


Figure 1. Body weight (mean±standard error of the mean) of the well-nourished (W; n=10; litters formed by 6 pups), malnourished (M; n=10; litters formed by 12 pups) and food restricted rats (FR; n=7; 30% diet restriction for 21 days at adulthood). Weights were measured on days 7, 14, 21, 30, 60 and 90. In the FR group (lower panel) the weight was measured only at 90 days of age. The asterisks indicate the M and FR values that are significantly different from the corresponding W controls ($p < 0.05$ unpaired T Test).

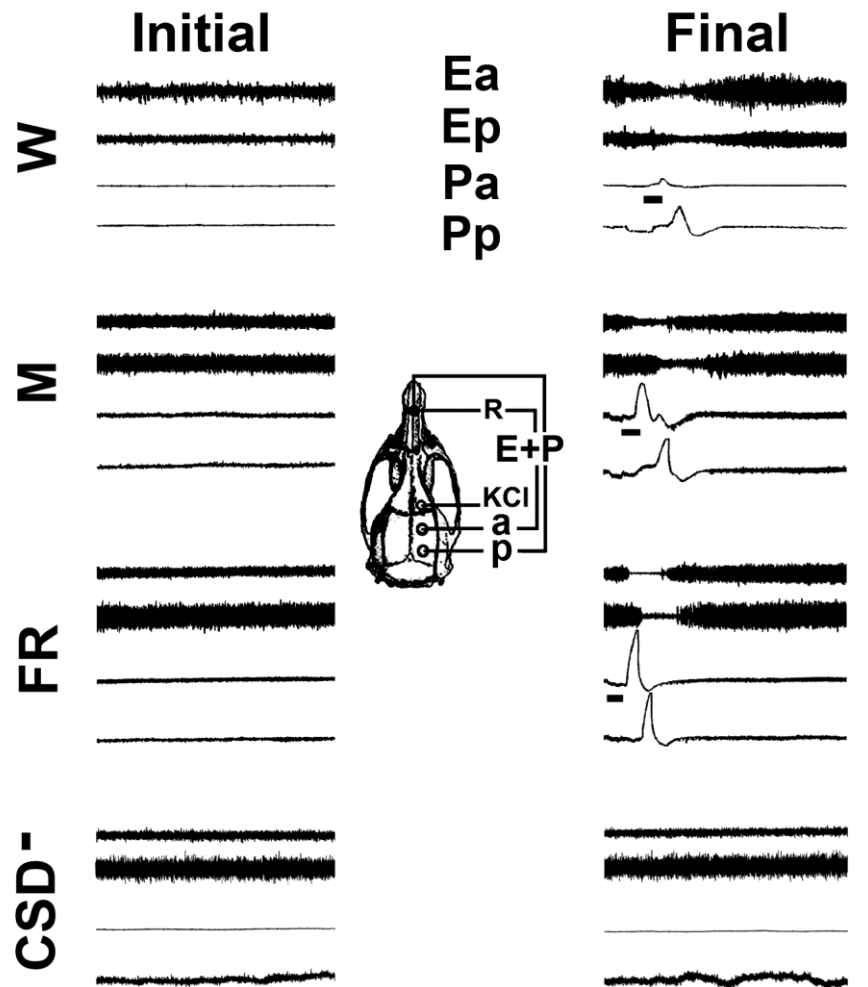


Figure 2. Examples of recordings of spontaneous cortical activity - Electrocorcogram (E) and DC-potential recordings (P) on the right hemisphere of four animals from three groups in which CSD was elicited at the final 2-h of the recording period (well-nourished [W], malnourished [M] and food restricted [FR]) and another W control group in which CSD was not elicited (CSD⁻). The inset shows the anterior (a) and posterior (p) recording positions, from which the traces marked at center with the same letters were obtained. The position of the common reference electrode (R) and the application place of stimulus (KCl) are also shown. The horizontal bars in Pa-traces indicate the period (1 min) in which stimulation with 2% KCl was applied to the frontal region of the same hemisphere, to elicit CSD. Vertical bars correspond to -10 mV in P

and -1 mV in E (negative upwards). For all groups, the left traces refer to the 2-h initial period (baseline period), and the right traces refer to the 2-h final period (in which CSD was elicited). In the three CSD groups (M, W and FR), an increase in the ECoG amplitude can be observed after CSD (right traces), as compared with the baseline ECoG (left traces) for the same animals. In the CSD-free group (CSD⁻), no amplitude increase could be seen.

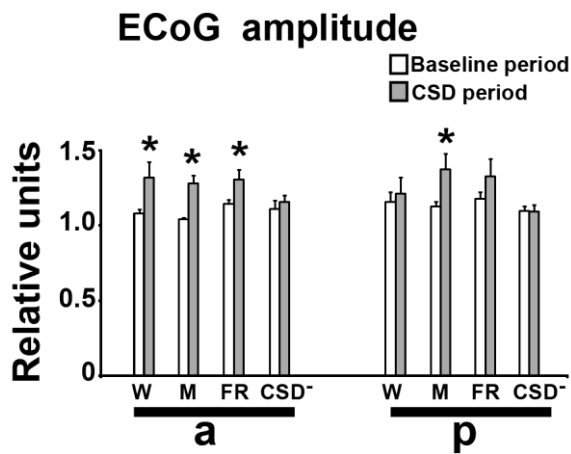


Figure 3. ECoG amplitudes in adult rats well-nourished (W; n=10), early-malnourished (M; n=10) and food-restricted at adulthood (FR; n=7). Data are presented as mean±s.e.m. relative units (values of the digitalized amplitudes normalized in relation to the lowest value, which was considered equal to 1). Compared to the baseline period (white bars), the amplitudes after CSD (gray bars) are significantly higher ($p < 0.05$) in all nutritional groups at the anterior point (a), as indicated by the asterisks. At the posterior recording point (p) the amplitude increase is significant only in the M group. In a fourth well-nourished control group, in which no CSD was elicited (CSD⁻; n=5), no amplitude increase was seen.

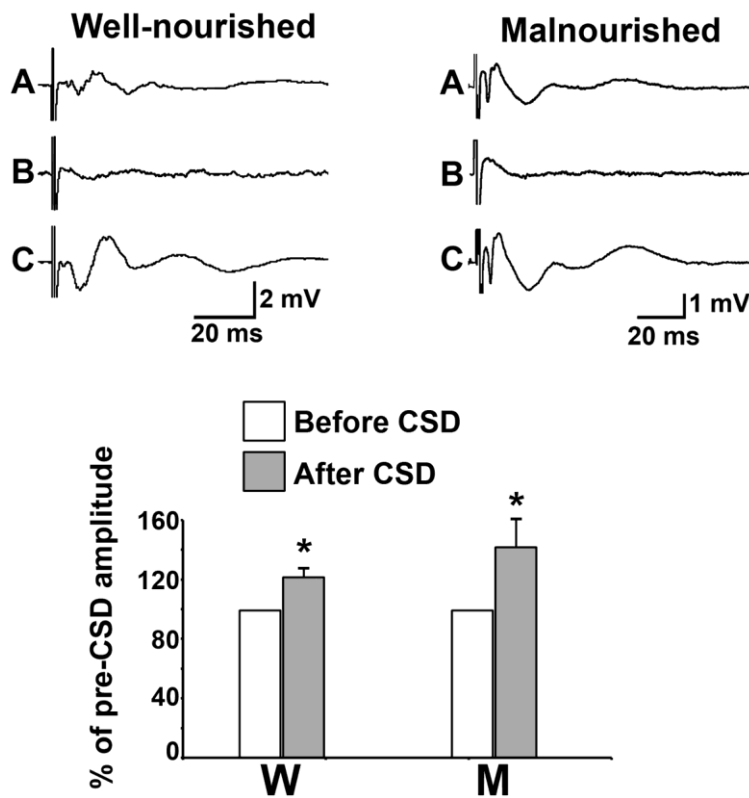


Figure 4. Recording of electrically elicited transcallosal evoked responses, recorded in the parietal cortex of one well-nourished (W) and one early-malnourished (M) rat. Electric stimulation (2V; 0.3 ms; 0.5 Hz) was carried out in the left parietal cortex and the evoked response was recorded on the homologous point of the right cortex. The upper panels show averages of 20 consecutive responses recorded before (A), during (B) and 45 min after CSD (C). Increases in the post-CSD evoked responses can be seen in C, as compared with A. Suppression of the responses during CSD is evident in B. The lower panel shows the quantification of this effect, with the asterisks indicating significant post-CSD increases in the amplitude of the evoked response in the W- and M-groups, as compared with the pre-CSD values (respectively 21.5±9.6% and 41.8±28.5%; $p < 0.01$; paired T-test).

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- a DAC potencia a amplitude da atividade elétrica cortical espontânea e evocada “*in vivo*”, sugerindo efeito semelhante à Potenciação de longa duração
- o aumento (potenciação) na amplitude do ECoG é modulado pelo estado nutricional do animal;
- a maior susceptibilidade da região “a” em relação à “p” indica diferenças regionais no córtex cerebral, com relação à potenciação associada à DAC;
- o aumento da amplitude do ECoG, observado em todos os grupos analisados não depende da variável tempo, uma vez que no grupo DAC⁻ as amplitudes não sofreram alterações;
- a redução do peso corporal, nos grupos D e RA confirma que os respectivos métodos foram efetivos em influenciar 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;
- investigar o impacto dos agentes anestésicos sobre a potenciação da atividade elétrica cortical induzida pela DAC, estudando animais em diferentes estados de vigília;
- verificar se os fatores estado anestésico, estado nutricional e envelhecimento apresentam interação.

7.0 REFERÊNCIAS

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, PCF; LIMA, DSC; OZIAS, MG; BATISTA-DE-OLIVEIRA, M; GUIMARÃES, NX; GUEDES, RCA. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adults rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, V. 200, 275-282, 2006.

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**, 219:492-498, 2009.

ANWYL, R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. **Neuropharmacology**, 56: 735–740, 2009.

BALLABRIGA, A. Some aspects of clinical and biochemical changes related nutrition during brain development in humans. In: EVERAR, P.; MINKOWSKI, A. **Developmental neurobiology**, New York: Raven Press, 271-286, 1989.

BARRET, D.E.; RADKE-YARROW, M. Effects of nutritional supplementation on children's responses to novel, frustrating and competitive situations. **American Journal and Clinical Nutrition**, v. 42, p. 102-120, 1985.

BEAR, M.F.; KIRKWOOD, A. Neocortical long-term potentiation. **Curr. Opin. Neurobiol**, 1993.

BÉGHIN, I. Abordagem causal em nutrição. In: Nutrição, Saúde & Comunidade (E. L. C. Gouveia, org.). **Revinter**, 181-193. Rio de Janeiro, 1990.

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.

BOZON, B.; KELLY, A.; JOSSELYN, A.S.; SILVA, A.J.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, 358: 805-814, 2003.

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.

COSTA-CRUZ, R.R.G. AND GUEDES, R.C. A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, 303: 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**, 401: 271-275, 2006.

DOBBING, J.; Undernutrition and the developing brain. **American Journal of Diseases**, v.120, p.411-415, 1970.

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

DO MONTE-SILVA, K.K.; ASSIS, F.L.; LEAL, G.M.; GUEDES, R.C. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, n. 3/4, p. 187-194, jun/ago, 2007.

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

FOLEY, A.G.; RONN, L.C.; MURPHY, K.J.; REGAN, C.M. Distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat septal nuclei and septo-hippocampal pathway: transient increase of polysialylated interneurons in the subtriangular septal zone during memory consolidation. **Journal Neuroscience Research**, 74: 806-817, 2003.

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

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**, 447: 26-30, 2008.

GHADIRI, M.K.; TUTAM, Y.; WASSMANN, H.; SPEKMANN, E.-J.; GORJI, A. Periodic fasting alters neuronal excitability in rat neocortical and hippocampal tissues. **Neurobiology of Disease**, 36: 384-392, 2009.

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

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.; ANDRADE, A.F.D.; CABRAL-FILHO, J.E. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 20: 639-642, 1987.

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.; DO CARMO, R.J. Influence of ionic alterations produced by gastric waging on cortical spreading depression. **Experimental Brain Research**, 39: 341-349, 1980.

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 adults rats. **Nutrition Neuroscience**, V. 5, n 2, p. 115-123, 2002.

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

GUEDES, R.C.A.; ROCHA-DE-MELO A.P; TEODÓSIO, N.R. Nutrição adequada a base para o funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, 56: 32-35, 2004.

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

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.

IZQUIERDO, I; CAMMAROTA, M.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATOJ.I.; BONINI, J.S.; MELLO,P; BENETTI,F.; COSTA,J.C.; MEDINA, J.H. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 1(80): 115-127, 2008.

KANDEL, E.R.; SQUIRE, L.R. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. **Science**, 290: 1113-1120, 2000.

KRIGMAN, M.R.; HOGAN, E.L. Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. **Brain Research**, v. 107, p. 239-255, 1976.

LEÃO, A.A.P. Further observation, on spreading depression of activity in cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, (10): 409-414, 1947.

LEÃO, A.A.P. The slow voltage variation of spreading depression of activity. **Journal of Neurophysiology**, (10): 409-414, 1947.

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

LEÃO, A.A.P. & MARTINS-FERREIRA, H. Nota acerca da depressão alastrante no cerebelo, tubérculo quadrigêmino anterior e bulbo olfativo. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 33: 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**, 30:I, 1958.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. São Paulo: Atheneu, 2004.

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 Science**, 85:241-247, 2009.

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

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**, 12 (2): 73-80, 2009.

MAIA, L.M.S.S; SANTOS, A.A. Alimentos e suas ações em sistemas fisiológicos. **VEREDAS FAVIP**, Caruaru, Vol. 2, nº 2, jul./dez. 2005 — Vol. 3, nºs. 1 e 2, p. 24–34, jan./dez., 2006.

MALENKA, R.C. The long-term potential of LTP. **Nature reviews**, (4): 923-926, 2003.

MALENKA, RC; NICOLL, RA. Long-term potentiation – a decade of progress? **Science**. V.285, 1999.

MONTEIRO, CA. 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.

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.; FÔRBES, 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**, (2): 137-230, 1978.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C. LAMANTIA, A-S; McNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. Plasticidade de sinapses e circuitos maduros, **Neurociências**. 2 ºed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RANADE, S.C.; ROSE, A.; RAO, M.; GALLEGOS, 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.

RICH, N.J.; VAN LANDINGHAM, J.W.; FIGUEIROA; SETH, R.; CORNIOLA, R.S.; LEVENSON, C.W. Chronic caloric restriction reduces tissue damage and improves spatial memory in a rat model of traumatic brain injury. **Journal Neuroscience Research**, V. 88, 2933-2939, 2010.

ROCHA-de-MELO, A.P.; CAVALCANTI, J.B; BARROS, A.S.; GUEDES, R.C.A. Manipulation of rat little size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, 9:155-160, 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**, 30: 663-669, 1997.

ROSE, S.P.R. Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term memory formation. **Trends Neuroscience**, 18: 502-506, 1995.

SANTOS, R.S. **Nutrição, hipertireoidismo 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.

SILVA, A. et al. 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**, 20: 383–392, 1987.

SOMJEN, G.G. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. **Physiological Reviews**, 81:1065–96, 2001.

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

TAKAHASHI, R.H.C. **Transformadas discretas de Fourier: motivação e aplicações.** I Bienal de Matemática. Belo Horizonte, 2002.

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**, 27:431-437, 2009.

TONKISS, J.; COHEN, C. A.; SPARBER, S.B. Different methods for producing neonatal undernutrition in rats cause different brain changes in the face of equivalent somatic growth parameters. **Developmental Neuroscience**, 3 (10): 141-151, 1988.

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

WERNSMANN, B; PAPE, H.-C.; SPECKMANN, E.-J.; GORJI, A. Effect of cortical spreading depression on synaptic transmission of rat hippocampal tissues. **European Journal of Neuroscience**, Vol. 23, p. 1103–1110, 2006.

WOLFF, G.L., KODELL, R.L., KAPUT, J.A. Caloric restriction abolishes enhanced metabolic efficiency induced by ectopic agouti protein in yellow mice. **Proc Soc Exp. Biol. Med.**, V. 221, p.99-104, 1999.

XIMENES-DA-SILVA, A; GUEDES, R.C.A. 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.

ANEXOS

ANEXO A – Confirmação da submissão do artigo ao periódico

De: "Experimental Neurology"<expn@elsevier.com> Enviado: Seg 17/01/11 16:16
Para: rc.guedes@terra.com.br
Assunto: Experimental Neurology: Submission Confirmation

Title: Increased cortical excitability after spreading depression in well-nourished and malnourished rats: in vivo cortical spontaneous and evoked potential analysis
Corresponding Author: Professor Rubem C. A. Guedes
Authors: Thays Kallyne M Souza, MS; Mariana B Silva; Andre R Gomes, MS; Helio M Oliveira, Ph.D.; Renato B Moraes; Catão Temistocles F Barbosa, Ph.D.;

Dear Professor Guedes,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Experimental Neurology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

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

Your username is: rubem.guedes

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/yexnr/automail_query.asp.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Experimental Neurology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address:

http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Experimental Neurology Elsevier
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495 USA
E-mail: expn@elsevier.com

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE

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, 15 de setembro 2009

Ofício nº 193/09

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
 Para: **Profº: Rubem Carlos Araújo Guedes**
 Departamento de Nutrição- CCS
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.006249/2004-82

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram a solicitação de mudança de título do projeto de pesquisa aprovado pelo ofício nº 124/2004 intitulado "Efeito da desnutrição sobre a potenciação da atividade elétrica cortical associado à depressão alastrante.

Atualmente o projeto é intitulado " Nutrição e excitabilidade cortical: efeitos sobre a potenciação da atividade elétrica associada à depressão alastrante".

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 CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansem
 Profa. Maria Teresa Jansem
 Presidente do CEEAA

Observação: Observação: Aluno de pós-graduação em Nutrição; Thays Marinho de Souza
 Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição, CCS; Animais: Ratos Wistar; Sexo: Machos; Idade: 70 - 80 dias; Nº de Animais previsto no projeto: 75 animais

ANEXO C - Composição da dieta “Labina” Purina do Brasil Ltda (especificada no rótulo do produto)

De acordo com a Purina do Brasil a composição básica da dieta “Labina” é: carbonato de cálcio, farelo de soja, farelo de trigo, feno de alfafa, fosfato bicálcico, milho integral moído, óleo de soja degomado, cloreto de sódio (sal comum), pré-mix vitamínico mineral, farinha de peixe.

Eventuais substitutivos: Farelo de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de glúten de milho-60, farelo de soja integral (grãos tostados), quirera de arroz, etoxiquin, gordura vegetal estabilizada, farinha de trigo.

Enriquecimento por Kg de Produto:

Ácido Fólico	14,00 mg
Antioxidante	150,00 mg
Biotina	0,20 mg
Cobalto	2,00 mg
Cobre	30,00 mg
Colina	2800 mg
Ferro	180,00 mg
Iodo	2,00 mg
Manganês	110,00 mg
Niacina	242,00 mg
Selênio	0,20 mg
Pantotenato de Cálcio	100,00 mg
Piridoxina	12,00 mg
Tiamina	12,00 mg
Vitamina A	28000 UI
Vitamina B12	44,00 mcg
Vitamina B2	28 mg
Vitamina D3	4.400,00 UI
Vitamina E	90,00 UI
Vitamina K	7,00 mg
Zinco	110,00 mg

Níveis de Garantia:

Umidade (máx.)	13,0%
Proteína Bruta (mín.)	23,0%
Extrato Etéreo (mín.)	4,0%
Matéria fibrosa (máx.)	8,0%
Matéria mineral (máx.)	10,0%
Cálcio (máx.)	1,5%
Fósforo (mín.)	0,8%