

MARIANA BARROS E SILVA GONDIM

Nutrição, natação e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos eletrofisiológicos sobre a potenciação do eletrocorticograma associada à depressão alastrante.

Recife-PE

2016

MARIANA BARROS E SILVA GONDIM

Nutrição, natação e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos eletrofisiológicos sobre a potenciação do eletrocorticograma associada à depressão alastrante.

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

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

Recife-PE
2016

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

G627n Gondim, Mariana Barros e Silva.
 Nutrição, natação e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos eletrofisiológicos sobre a potenciação do eletrocorticograma associada à depressão alastrante / Mariana Barros e Silva Gondim.– 2016.
 104 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Desnutrição. 2. Natação. 3. Depressão alastrante da atividade elétrica cortical. 4. Potenciação de longa duração. 5. Sistema nervoso central. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-138)

Mariana Barros e Silva Gondim

Nutrição, natação e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos eletrofisiológicos sobre a potenciação do eletrocorticograma associada à depressão alastrante.

Tese aprovada em: 26 de fevereiro de 2016

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Ana Paula Rocha de Melo / UFPE

Prof^a Dra. Carol Virginia Gois Leandro / UFPE

Prof^a Dra. Juliana Maria Carrazzone Borba / UFPE

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues / UFPE

Prof^a Dra. Raquel da Silva Aragão / UFPE

Recife
2016.

À minha família. Ela é meu alicerce, a base de tudo que sou; o que dá sentido à vida, e sempre me dá forças para concretizar meus sonhos, como a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu agradecimento maior, por ser essencial em minha vida, por me dar orientação, força, coragem e sabedoria durante esses anos de trabalho e por estar sempre ao meu lado, me concedendo infinitas bênçãos, em todos os aspectos da minha vida.

Agradeço de forma especial a minha mãe, Dora Barros. Obrigada pelo cuidado, dedicação, por sua capacidade de me trazer paz na correria do dia a dia e principalmente pelo AMOR INCONDICIONAL! Sua presença certa me deu conforto e proporcionou segurança e coragem para concluir essa etapa de minha caminhada. Cresci vendo a mulher guerreira que você é, sempre se doando ao máximo ao trabalho e aos filhos. Você despertou em mim essa busca pelo conhecimento e mostrou a importância dos estudos e trabalho em nossas vidas. Não teria como expressar o amor e orgulho que sinto. Serei sempre grata a você por tudo que representa para mim e a Deus por ter colocado você na minha vida.

Ao meu marido Jorge Luís Gondim, pessoa com quem amo compartilhar a vida! Obrigada amor pelo incentivo profissional, por me dar força e coragem nos momentos de dificuldades, pelo carinho e apoio durante essa caminhada, pela forma especial que você cuida de mim e de nossa Lua, que embora não saiba, também me dá muita força e alegra nossos dias!!! Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção são bem melhores e mais revigorantes!!!

Aos meus irmãos, Expedito Júnior, Paulo Roberto e Cristiane; cunhados Mariana, Harleny e Cláudio; sobrinha, Maria Luísa; vó Lourdes; Tia Gorett e demais familiares. Presença fundamental para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Cada um de vocês, de alguma forma, teve uma participação especial na concretização desse projeto. Anjos que Deus colocou na minha vida!!! Obrigada pela compreensão nas minhas ausências, pelo apoio e carinho de sempre!

Ao meu orientador Rubem Carlos Araújo Guedes, por todos os ensinamentos. Nossa jornada teve início na graduação, durante o estágio de iniciação científica e desde então tive o privilégio de aprender com esse mestre exemplar. Obrigada Professor, por transmitir com dedicação seus conhecimentos, orientações e experiências de vida. Obrigada pela paciência e

compreensão em diversos momentos. Obrigada pela oportunidade de crescimento profissional, pela confiança, amizade, apoio e incentivo. A minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa. Orgulho-me de ter um orientador como o senhor, sempre dedicado aos alunos, aulas e pesquisa, com muita competência e humildade. Um exemplo a ser seguido! O senhor terá sempre meu carinho, admiração e gratidão por tudo que me ensinou, não só na ciência, mas também na vida!

Às professoras Ana Paula Melo, Luciana Maia e Cássia Borges, por seus ensinamentos durante as qualificações e atividades ao longo dessa pesquisa.

Ao Professor Marcelo Cairrão, pela colaboração imprescindível no desenvolvimento do algoritmo para análise dos dados eletrofisiológicos no software MATLAB e pela disposição em ajudar durante o trabalho realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, aos funcionários do Departamento de Nutrição, e a todos que fazem parte do LAFINNT, em especial Neci, Cecília e Fernanda, pela dedicação e responsabilidade durante esses anos. Agradeço também a Thays, pela colaboração no desenvolvimento de parte deste trabalho e a Elian, pela amizade sincera desde a graduação. Aos demais amigos do laboratório: Cássia, Nora, Manuella, Andréa, Ricardo, Denise, Paula, Regina, Suênia, Larissa, Rosângela, Camila, Liliane, Catarina, pela amizade, ensinamentos diversos, ajuda em vários momentos e por terem compartilhado parte desta caminhada.

Aos estagiários do LAFINNT, em especial Débora, Marcela, Ricardo e Ana Jéssica pela dedicação ao estágio e pela ajuda no cuidado com os animais.

Ao veterinário Edeones França, pela competência e eficiência no cuidado e no fornecimento dos animais. Pela disposição em ajudar sempre que solicitado.

À Capes pelo apoio financeiro, através da bolsa de doutorado, que me deu suporte na realização desta pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” CORA CORALINA

RESUMO

A nutrição no início da vida e o exercício físico podem alterar a excitabilidade cerebral, interferindo em processos de desenvolvimento e em parâmetros eletrofisiológicos. A depressão alastrante cortical (DAC) é um fenômeno relacionado com a excitabilidade cerebral. Em estudos anteriores, demonstramos potenciação da atividade elétrica cortical espontânea (ECoG) após a DAC. Nesta tese investigou-se a influência das condições de lactação e do exercício de natação, no início da vida e na idade adulta, sobre essa potenciação. Ratos Wistar machos foram amamentados em ninhadas com 6 ou 12 filhotes (grupos L_6 e L_{12}). A natação, precoce e tardia, foi realizada entre 8-23 e 60-75 dias de vida, respectivamente. O ECoG foi registrado aos 90-120 dias. Com um algoritmo específico (software Matlab™), determinou-se a amplitude do ECoG. Diferenças intergrupos de peso corporal e encefálico ($L_{12} < L_6$) confirmaram a deficiência nutricional do grupo L_{12} . Diferenças, no mesmo animal, entre as amplitudes do ECoG antes e depois da DAC confirmaram a potenciação pós-DAC. Um grupo que não sofreu DAC não apresentou potenciação do ECoG. A natação precoce reduziu, e a tardia aumentou, essa potenciação do ECoG. A deficiência nutricional (condição L_{12}) atenuou esse efeito. Estes dados sugerem que “condição de lactação”, “exercício de natação” e “idade ao exercício” modulam a potenciação do ECoG. A relevância desses resultados na fisiopatologia de doenças neurológicas dependentes da excitabilidade cerebral, como enxaqueca com aura e epilepsia, merecem futura investigação.

PALAVRAS-CHAVE: Desnutrição. Natação. Depressão Alastrante da Atividade Elétrica Cortical. Potenciação de Longa Duração. Sistema nervoso central.

ABSTRACT

Nutrition in early life and physical exercise can alter brain excitability, interfering with development processes and electrophysiological parameters. Cortical spreading depression (CSD) is a phenomenon related to brain excitability. In previous studies, we demonstrated spontaneous brain electrical activity (ECoG) potentiation after CSD. In this thesis investigated the influence of the lactation conditions and swimming exercise in early life and adulthood, on this potentiation. Male Wistar rats were suckled in litters with 6 or 12 pups (L_6 and L_{12} groups). The swimming, early and late, was carried out between 8-23 and 60-75 days of age, respectively. The ECoG was recorded at 90-120 days. With a specific algorithm (software Matlab TM), we determined the amplitude of the ECoG. Intergroup differences in body- and brain- weight ($L_{12} < L_6$) confirmed the nutritional deficiency of the L_{12} group. Differences, in the same animal, between ECoG amplitudes before and after the CSD confirmed the post-CSD potentiation. A group that did not suffer CSD displayed no ECoG potentiation. Early swimming reduced, and later increased, this ECoG potentiation. The nutritional deficiency (L_{12} condition) attenuated this effect. These data suggest that "lactation condition", "swimming exercise" and "age to exercise" modulate ECoG potentiation. The relevance of these findings in the pathophysiology of brain excitability-dependent neurological diseases, such as migraine with aura and epilepsy, deserve further investigation.

KEY WORDS: Malnutrition. Swimming. Cortical Spreading Depression. Long-Term Potentiation. Central Nervous System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação, no rato e no homem, dos períodos de desenvolvimento neural	20
Figura 2. Esquema de eventos durante a Depressão Alastrante Cortical	22
Figura 3. Trechos representativos do Registro eletrofisiológico da DAC (ECoG e VLV)	40

ARTIGO 1

Figura 1. Pesos corporais e cerebrais	65
Figura 2. Trechos representativos do registro e Amplitudes do ECoG - grupos L ₆	67
Figura 3. Trechos representativos do registro e Amplitudes do ECoG - grupos L ₁₂	69

ARTIGO 2

Figura 1. Pesos corporais e cerebrais	81
Figura 2. Trechos representativos do registro e Amplitudes do ECoG – grupos CSD	83
Figura 3. Trechos representativos do registro e Amplitudes do ECoG - grupos CSD free	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições que facilitam a propagação da DAC	24
Tabela 2 – Condições que dificultam a propagação da DAC	25
Tabela 3 – Descrição dos grupos experimentais	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CA1	Região hipocampal denominada “cornus Amoni” 1
CCS	Centro de Ciências da Saúde
d	Distal
DAC	Depressão Alastrante Cortical
ECoG	Eletrocorticograma
EEG	Eletroencefalograma
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
KCl	Cloreto de Potássio
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
LTP	Potenciação de Longa Duração
L₆	Lactação favorável (ninhadas com 6 filhotes)
L₁₂	Lactação desfavorável (ninhadas com 12 filhotes)
n	Near
NMDA	N-metil-D-aspartato
p	Proximal
r	Remote
s.c.	Subcutâneo
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLV	Variação Lenta de Voltagem

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Nutrição e Funções Neurais	16
2.2 Depressão Alastrante Cortical	21
2.3 Potenciação da atividade elétrica Cerebral	28
2.4 Exercício Físico	30
3. PERGUNTA CONDUTORA	34
4. HIPÓTESES	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 Geral	35
5.2 Específicos	35
6. MÉTODOS	36
6.1 Animais	36
6.2 Determinações ponderais	37
6.3 Exercício Físico	37
6.3.1 Natação Precoce	37
6.3.2 Natação Tardia	38
6.3.3 Grupos Controle para o exercício	38
6.4 Procedimento cirúrgico e Registro Eletrofisiológico	38
6.5 Eutanásia	40
6.6 Grupos experimentais	41
6.7 Análise quantitativa dos sinais elétricos corticais	42
6.8 Análise Estatística	43
7. RESULTADOS	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE (S)	57
<i>Apêndice A –Protocolo do Animal</i>	57
<i>Apêndice B –Artigo 1</i>	58
<i>Apêndice C –Artigo 2</i>	77
ANEXO (S)	102
<i>Anexo A -Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE</i>	102
<i>Anexo B -Submissão do Artigo I</i>	103
<i>Anexo C - Submissão do Artigo II.</i>	104

1. APRESENTAÇÃO

Uma nutrição apropriada, com ingestão equilibrada de todos os nutrientes, bem como a prática de exercícios ao longo da vida, pode melhorar a função cerebral (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; GUEDES, 2011; MAIA e SANTOS, 2006). O exercício físico tem ação benéfica inquestionável sobre a saúde humana (DHUTIA e SHARMA, 2015), tanto no início da vida como na vida adulta, incluindo efeitos favoráveis sobre o desenvolvimento e funcionamento do cérebro (SOUZA et al., 2009; ZHONG et al., 2016) e atenuação dos déficits neurais associados com o envelhecimento (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; BERCHICCI; LUCCI; DI RUSSO, 2013). Muitos estudos fisiológicos têm utilizado o exercício em esteira, mas, recentemente tem-se despertado o interesse por estudos com o exercício de natação. Experimentalmente, tem-se demonstrado que a natação exerce efeitos positivos sobre a função cerebral (KO et al., 2013; ZHONG et al., 2016). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos neurais da interação entre o exercício de natação e outros fatores, como uma deficiência nutricional no início da vida.

A manutenção de um estado nutricional adequado, principalmente no início do desenvolvimento, tanto em humanos como em outros mamíferos, é de suma importância, pelas repercussões que alterações nutricionais na infância podem acarretar na vida adulta, sobretudo no que se refere ao sistema nervoso (SN) (GUEDES, 2011). No entanto, a desnutrição infantil ainda se constitui em um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (BELLUSCIO et al., 2014; FRAGA e VARELA, 2012).

Existem diversos modelos para induzir a desnutrição em animais de laboratório. Dentre eles, podemos destacar o aumento do tamanho da ninhada no período de lactação, que em ratos pode afetar o estado nutricional (DE LUCA; CIOFFI; BURES, 1977; MAIA et al., 2006; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). A desnutrição precoce pode alterar processos fisiológicos, tais como consciência, cognição, aprendizagem, memória, emoção e excitabilidade cerebral (MORGANE et al., 1978).

Os efeitos neurais de uma desnutrição precoce podem ser investigados utilizando-se diversos métodos, como por exemplo, o registro da atividade elétrica cerebral. Com esse método, pode-se estudar o fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC), que está relacionado com a excitabilidade cerebral, e cuja importância clínica é baseada em sua relação com importantes doenças neurológicas humanas, como a epilepsia, enxaqueca, lesão cerebral

traumática, e isquemia cerebral (DREIER, 2011; LAURITZEN et al., 2011; WEI; ULLAH; SCHIFF, 2014).

Durante a DAC, embora a atividade elétrica espontânea normal do registro eletroencefalográfico (ECoG) esteja deprimida, ondas “epiletiformes” anormais, de alta amplitude, podem aparecer (LEÃO, 1944 a, 1944b). Isto sugere uma relação entre a DAC e a potenciação de longa duração (LTP), fenômeno que corresponde a um aumento de longa duração na eficácia sináptica (IZQUIERDO et al., 2008; MALENKA, 2003). Alguns trabalhos demonstraram que a DAC pode induzir um efeito semelhante à LTP, em ratos *in vitro* (FOOTITT e NEWBERRY, 1998) e *in vivo* (FARAGUNA et al., 2010; SOUZA et al., 2011, 2015), bem como em tecido cerebral humano *in vitro* (GORJI e SPECKMAN, 2004).

Considerando a escassez de estudos que analisam os efeitos eletrofisiológicos cerebrais da associação 'nutrição-exercício' e a importância dos dois fatores para a saúde humana, este trabalho teve como objetivos investigar o efeito dessa interação na potenciação do ECoG que é causada pela DAC (SOUZA et al., 2011, 2015), e verificar se o período da vida em que o exercício foi realizado tem efeitos diferentes sobre essa relação. Neste contexto, nossas hipóteses foram: (1) o exercício de natação influencia o efeito de potenciação do ECoG pós-DAC; (2) a deficiência nutricional durante o período de lactação interage com o exercício e modula esse efeito; (3) períodos diferentes de realização do exercício exibem efeitos diferentes sobre a potenciação do ECoG pós-DAC.

Distúrbios do funcionamento cerebral na vida adulta, associados ou não a disfunções de natureza nutricional durante o desenvolvimento, representam um problema de saúde pública, cujo tratamento, em muitos casos, é de alto custo econômico e social. Isso tem motivado diversos estudos a respeito da relação cérebro-nutrição-exercício físico. A presente investigação pôde contribuir com informações acerca dessa relação, e os resultados estão descritos em dois artigos originais, submetidos para publicação em revistas internacionais, que publicam artigos na área da Neurociência. O primeiro artigo intitulado “Early swimming exercise differentially modulates electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats previously suckled in different litter sizes”, foi submetido à publicação na Revista Neuroscience Letters, que é classificada como qualis internacional B1 pela Capes, com fator de impacto de 2,030 (ANEXO B). O segundo artigo intitulado “Swimming exercise in adult rats that were previously suckled under different litter sizes: effects on the electrocorticogram potentiation after spreading depression”, foi submetido à publicação na Revista Brain Research, que é classificada como qualis internacional A2 pela Capes, com fator de impacto de 2,843 (ANEXO C).

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nutrição e Funções Neurais

Nutrição é a ciência que estuda as diversas etapas que um alimento sofre, desde a sua introdução no organismo até sua eliminação. Este estudo abrange os alimentos, bem como sua ação, interação e balanço em relação à saúde e doença. A alimentação, ou seja, o ato de alimentar-se é uma ação consciente, que depende da vontade de cada indivíduo. Já a nutrição – processo biológico de assimilação dos nutrientes – é um ato involuntário, que ocorre apenas com a introdução do alimento no sistema digestório. (MORGANE et al., 1993; PHILIPPI et al., 2003). 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).

O importante papel da alimentação e nutrição em saúde pública está sendo cada vez mais reconhecido como crucial, pelo seu impacto na qualidade de vida, no que diz respeito a saúde e economia, tanto a nível social como individual. Crescentes evidências científicas e epidemiológicas demonstram uma relação clara entre alimentos e manutenção da saúde/desenvolvimento de doenças (LENOIR-WIJNKOOP et al., 2011; WHO/FAO, 2003).

Dessa forma, a alimentação e a nutrição representam processos básicos indispensáveis para a manutenção da vida. Toda a sequência dos mecanismos envolvidos nesses processos, desde a procura de alimentos até a absorção de nutrientes, é regulada com a participação de estruturas neurais e por mecanismos neuro-humorais controlados pelo sistema nervoso – SN (GUEDES, 2011). Muitos desses mecanismos dependem da secreção de neurotransmissores, substâncias que proporcionam a comunicação neuronal e que muitas vezes dependem de precursores presentes nos alimentos. Assim, compreender a relação recíproca entre nutrição e SN é essencial, considerando-se o papel fundamental do SN na integração e coordenação de todas as funções do organismo (GUEDES, 2011; MAIA e SANTOS, 2006).

Cada indivíduo tem necessidades específicas e precisa de quantidades e proporções de nutrientes diferentes para manter o bom funcionamento do organismo. Para atingir esses requerimentos é imprescindível seguir as Leis da Alimentação (quantidade, qualidade, harmonia e adequação), criadas pelo médico e professor argentino Pedro Escudero em 1934. A quantidade corresponde a suficiência calórica da alimentação para repor as perdas energéticas do organismo e manter em equilíbrio o seu balanço; a qualidade, refere-se à

variabilidade de alimentos e o seu teor de nutrientes, o que permite usar esquemas de substituição e equivalência; a harmonia, é a proporcionalidade entre os nutrientes e o valor calórico total; e, finalmente, a adequação, pelo respeito à individualidade de cada organismo. O momento biológico (infância, adolescência, adulto, idoso, doenças, gestação, lactação, etc.), hábitos individuais, condições socioeconômicas e culturais são fatores que interferem nos requerimentos nutricionais (LIMA, 2009).

Portanto, o fornecimento de uma dieta quantitativamente suficiente, qualitativamente completa, harmoniosa e adequada a cada indivíduo, é crucial em todas as etapas da vida (MAIA e SANTOS, 2006; PHILIPPI et al., 2003). Tratando-se do SN, em especial no início da vida, um dos fatores não genéticos essenciais no que diz respeito a influência positiva sobre o cérebro em desenvolvimento é a assimilação adequada de nutrientes (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Do mesmo modo que outros países em desenvolvimento, o Brasil tem vivenciado uma transição nutricional nas últimas décadas (BATISTA FILHO e RISSIN, 2003; BISCEGLI et al., 2007; MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004). O conceito de transição nutricional abrange grandes mudanças no perfil nutricional de populações humanas. Estas mudanças estão diretamente relacionadas com modificações na ingestão alimentar e são determinadas pela interação de mudanças econômicas, demográficas, ambientais e culturais que ocorrem na sociedade (MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004). O cenário nutricional do país tem apresentado rápidas e grandes mudanças, com alterações claras na magnitude da subnutrição e da supernutrição. A camada mais pobre da população apresenta uma diminuição simultânea da prevalência de desnutrição grave e um aumento de sobrepeso e obesidade (BATISTA FILHO e RISSIN, 2003; BISCEGLI et al., 2007; MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004).

No entanto, a desnutrição é uma preocupação mundial, e ainda constitui-se em um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. Essa doença atinge pessoas de todas as idades, mas as maiores vítimas são as crianças, havendo um impacto considerável sobre os índices de morbidade e de mortalidade infantil (FRAGA e VARELA, 2012; GUEDES, 2011). Embora o número dos atingidos pela desnutrição tenha declinado consideravelmente, o problema não foi solucionado por completo, e ainda existem muitas crianças desnutridas no país (BELLUSCIO et al., 2014; FRAGA e VARELA, 2012; GUEDES, 2011; LENOIR-WIJNKOOP et al., 2011; MONTE, 2000; MONTEIRO et al., 2009).

A desnutrição é uma condição de origem complexa e de múltiplas causas. É mais correto usar o termo deficiências nutricionais, uma vez que são várias as modalidades de

desnutrição. São doenças que decorrem do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou ainda do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, resultando na carência dos nutrientes necessários para que o organismo realize seu metabolismo fisiológico. (FRAGA e VARELA, 2012; MONTE, 2000; MONTEIRO, 2003).

Dentre os fatores relevantes na gênese da desnutrição destacam-se a desnutrição intrauterina e pós-natal, os partos prematuros, ingestão insuficiente de alimentos capazes de suprir as necessidades do organismo, a incidência repetida de infecções, em particular doenças diarreicas e parasitoses intestinais, além do fraco vínculo mãe-filho e da falta de recursos financeiros. É importante destacar que, muitas vezes, a desnutrição ocorre não pela falta de alimentos, mas pela falta de conhecimentos adequados sobre a saúde e nutrição da criança, o que pode gerar práticas inadequadas de cuidado infantil tais como falta ou abandono precoce do aleitamento materno, retardo na introdução de alimentos complementares adequados, administração de alimentos muito diluídos e/ou não higienicamente preparados (BATISTA FILHO e RISSIN, 2003; BISCEGLI et al., 2007; MONTE, 2000; MONTEIRO, 2003).

São muitos os riscos provenientes da desnutrição (BISCEGLI et al., 2007); durante os primeiros estágios da vida pode resultar em inúmeros problemas cerebrais, incluindo o aumento das chances de desenvolver doenças neurológicas, como a epilepsia (CABRAL et al., 2011). Déficits nutricionais na gestação e na infância, principalmente no primeiro ano de vida, estão associados à maior mortalidade, excesso de doenças infecciosas, atraso no crescimento e no desenvolvimento motor e neurológico, alterações da estrutura e neuroquímica cerebral, menor aproveitamento escolar e aumento significativo na incidência de comprometimento do QI no adulto, o que pode acarretar uma morbidade funcional ao longo da vida, com menor capacidade produtiva na vida adulta (BELLUSCIO et al, 2014; FRAGA e VARELA, 2012; MONTE, 2000; MONTEIRO et al., 2009; RANADE et al., 2012; WABER et al., 2014; WARTELOW, 1997). Por esses motivos, a doença torna-se uma preocupação social, pois essas alterações podem interferir de forma significativa na qualidade de vida e inclusão social das vítimas (BISCEGLI et al., 2007).

A deficiência nutricional é mais nociva se ocorre cedo na vida pós-natal, porque nessa fase o crescimento corporal é muito acelerado e a necessidade de calorias, proteínas e outros nutrientes é máxima, principalmente em relação ao SN (GUEDES, MONTEIRO, TEODÓSIO, 1996). Porto et al. (2010) mostraram que a desnutrição precoce acarreta déficit neuronal, com alterações cognitivas e modificações no desenvolvimento e crescimento em modelos experimentais. Isto ocorre porque no início da vida há maior vulnerabilidade neural a

diversos estímulos, como por exemplo, às agressões nutricionais. Nesse período inicial, o cérebro apresenta crescimento e desenvolvimento muito rápidos, através de processos como hiperplasia, hipertrofia, migração celular, mielinização e organização das sinapses (BALLABRIGA, 1989; GUEDES, MONTEIRO, TEODÓSIO, 1996; MORGANE et al., 1978; MORGANE et al., 1993).

O aporte inadequado de um ou mais nutrientes na alimentação diária do organismo em desenvolvimento pode, sem dúvida, perturbar a organização morfológica e bioquímica de um ou mais dos processos descritos acima, levando geralmente a alterações nas funções cerebrais, as quais eventualmente podem ser permanentes (GUEDES, 2011; FRAZÃO et al., 2008; MORGANE et al., 1978). Isso vai depender da intensidade e da duração da deficiência nutricional, bem como do estágio de desenvolvimento do órgão, na época em que ocorrer a desnutrição (GUEDES, MONTEIRO, TEODÓSIO, 1996; GUEDES, 2011; MORGANE et al., 1978).

A essa fase de desenvolvimento e crescimento rápidos do SN denomina-se “período crítico de desenvolvimento” ou “período de crescimento rápido do cérebro”. É considerado um período crítico ou de maior vulnerabilidade a vários tipos de agressões, como a desnutrição (DOBBING e SMART, 1974). Este período ocorre em épocas distintas, a depender da espécie de mamífero. Nos seres humanos inicia-se no período pré-natal (último trimestre de gestação) e vai até o final dos primeiros dois a quatro anos de vida pós-natal; já no rato – animal comumente utilizado em estudos neurofisiológicos experimentais - coincide com o período de aleitamento, isto é, as três primeiras semanas de vida pós-natal (MORGANE et al., 1993; SCRIMSHAW e GORDON, 1968; Figura 1).

É comum o uso de modelos animais para analisar processos cerebrais afetados por uma deficiência nutricional. Assim, é importante saber que o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em fases, que seguem uma sequência precisa, e varia de acordo com as regiões cerebrais. Entre as espécies de mamíferos, não há grande diferença nessa sequência de processos do desenvolvimento do cérebro, porém o tempo do nascimento em relação ao estágio de maturação cerebral é diferente (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002; Figura 1).

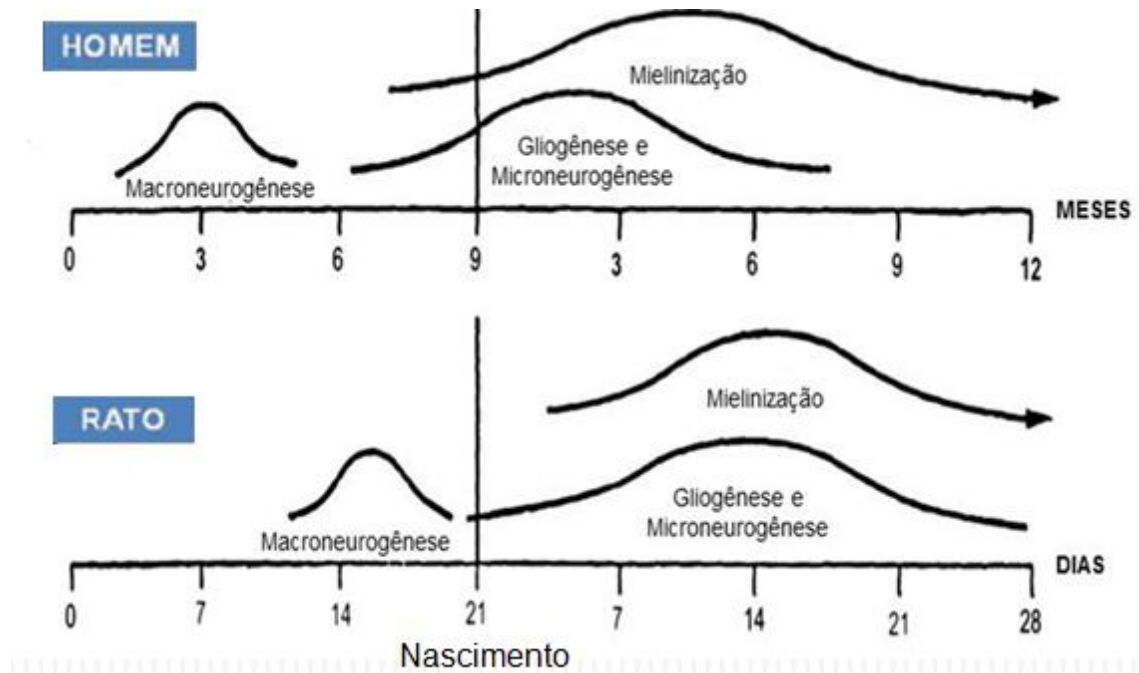


Figura 1 – Esquema de comparação, no homem e no rato, dos principais eventos de desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo as fases pré- e pós-natal. Figura adaptada do artigo de Morgane et al, 1993.

Alguns modelos experimentais têm sido utilizados com sucesso para provocar a subnutrição, como por exemplo, a privação dos filhotes à presença materna ou redução na quantidade de dieta ofertada (ALAMY e BENGELLOUN, 2012). No rato Wistar, mamífero utilizado nessa pesquisa, uma forma efetiva de se alterar o estado nutricional consiste em variar a competição dos filhotes pelo leite materno, modificando-se o tamanho das ninhadas. Esse fato tem sido confirmado em alguns trabalhos (AMÂNCIO DOS SANTOS et al., 2006; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; DE LUCA et al., 1977; FRANCISCO e GUEDES, 2015; FRAZÃO et al., 2008; MAIA et al., 2006; ROCHA DE MELO et al., 2004, 2006; TONKISS et al., 1988). Esses autores demonstraram que o número de filhotes na ninhada durante a lactação é um fator que pode influenciar o desenvolvimento do SN, alterando alguns de seus parâmetros eletrofisiológicos. Dentre estes, estão os que caracterizam a Depressão Alastrante Cortical (DAC), fenômeno utilizado neste estudo e explanado no tópico seguinte.

2.2 Depressão Alastrante Cortical

O fenômeno conhecido como “depressão alastrante cortical” (DAC) foi descrito pela primeira vez pelo neurocientista brasileiro Aristides Azevedo Pacheco Leão, quando realizava estudos sobre a epilepsia experimental, na superfície do córtex cerebral de coelhos. Leão (1944a) se referiu à DAC como uma “onda” reversível e propagável de redução (depressão) da atividade elétrica cerebral, em resposta a estímulos elétricos, químicos ou mecânicos, acompanhada do aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno (LEÃO, 1947; Figura 2).

Tanto a depressão do eletrocorticograma (ECoG), quanto a VLV se propagam (alastram) de forma concêntrica a partir do ponto estimulado, a uma velocidade de 2 a 5 mm/min, atingindo gradualmente regiões corticais mais distantes, enquanto que a área inicialmente deprimida começa a se recuperar também de forma concêntrica (Figura 2). Ao final de cerca de dez a quinze minutos todo o tecido cortical acha-se recuperado (GUEDES; ROCHA-DE-MELO; TEODÓSIO, 2004; GUEDES, 2011).

A VLV é observada na região cortical invadida pela DAC: 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, 1951). Além dessa despolarização, ocorrem algumas alterações, como a dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944b), e mudanças na distribuição de íons entre os meios extra e intracelular. Há um influxo de H^+ e K^+ , e um efluxo de Ca^{++} , Na^+ e Cl^- juntamente com a água, provocando um aumento do volume celular e diminuição do espaço extracelular (GORJI, 2001). Todas essas modificações são reversíveis.

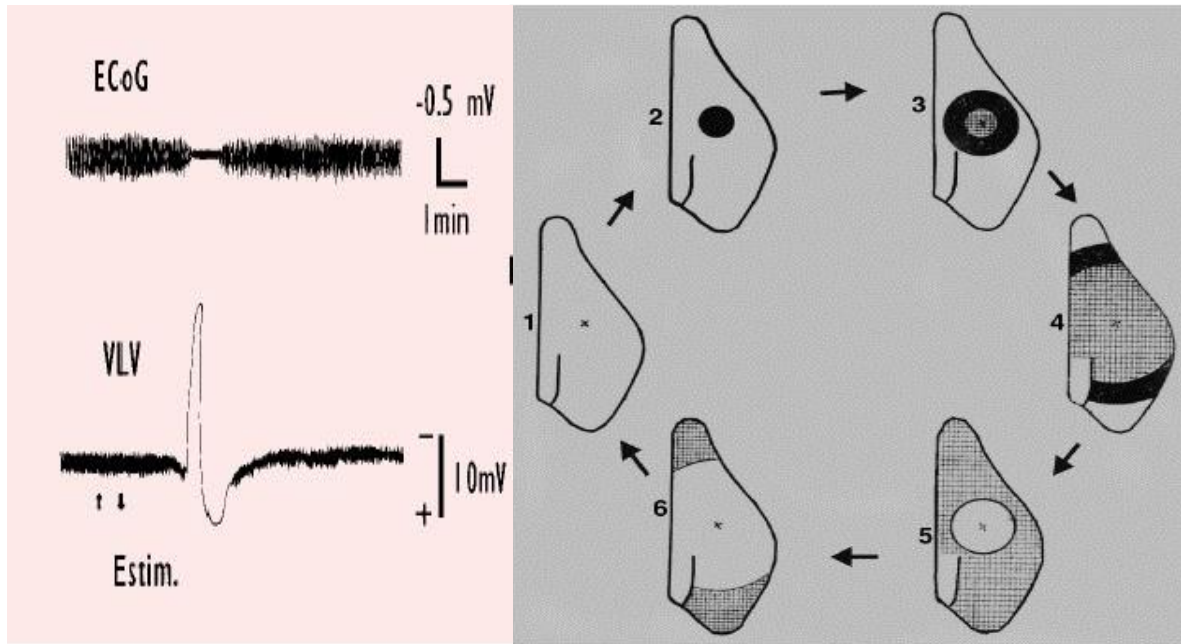


Figura 2 – À direita, esquema ilustrando a sequência de eventos (numerados de 1 a 6) que ocorrem durante a depressão alastrante cortical (DAC), no córtex cerebral de um coelho anestesiado (esquema adaptado de uma ilustração original do professor Hiss Martins-Ferreira). No momento 1, um ponto cortical (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 sucessivamente 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 DAC tem sido demonstrada não só em aves, répteis e anfíbios, como também no córtex cerebral de mamíferos, inclusive no homem (BERGER et al., 2008; DOHMEN et al., 2008; GORJI e SPERCKMANN, 2004; MAYEVSKY et al., 1996; SOMJEN, 2001). O fenômeno foi evidenciado em várias estruturas do SNC como núcleo caudado, tubérculo quadrigêmio, bulbo olfatório, córtex cerebelar, medula espinhal e teto óptico (FIFKOVA et al., 1961; GUEDES; TSURUDOME; MATSUMOTO, 2005; LEÃO e MARTINS

FERREIRA, 1958, 1961; STREIT, FERREIRA-FILHO e MARTINS-FERREIRA, 1995), sendo mais facilmente provocado em algumas áreas que em outras (SOMJEN, 2001).

Este fenômeno, relacionado com a excitabilidade neuronal, tem sido usado como modelo experimental para avaliar o funcionamento e desenvolvimento do SNC (GUEDES, 2011). Do ponto de vista clínico, o estudo da DAC é potencialmente relevante pois está relacionada com importantes doenças neurológicas humanas, como as epilepsias, a isquemia cerebral, a enxaqueca com aura, a esclerose múltipla e injúria traumática cerebral. A possível relação entre os mecanismos da DAC e o dessas enfermidades com desordens na excitabilidade cerebral vem sendo demonstrada através de evidências clínicas e experimentais em diversos estudos (CHARLES e BACA, 2013; DREIER, 2011; DREIER et al., 2012; FABRICIUS et al., 2008; FERRARI et al., 2015; GUEDES e CAVALHEIRO 1997; GOADSBY, 2006; KURTH et al., 2012; LAURITZEN et al., 2011; LEÃO, 1944b; MOSKOWITZ, 2007; PUSIC et al., 2015; TORRENTE et al., 2014a; WEI; ULLAH; SCHIFF, 2014). Assim, fatores que influenciam o fenômeno da DAC, podem gerar dados que ajudam a entender como a DAC se relaciona com essas doenças, o que justifica, mais uma vez, a relevância deste estudo.

Situações experimentais que interfiram na oposição natural do tecido à propagação da DAC podem ser relevantes na compreensão de seus mecanismos. No Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do CCS/UFPE, investiga-se até que ponto modelos animais submetidos a diversas condições experimentais, especialmente as relacionadas à nutrição e ao exercício físico, podem sofrer alterações nos aspectos estruturais e funcionais do SN, e como essas modificações influenciam a susceptibilidade do tecido cortical à DAC. Neste laboratório, tem-se demonstrado que algumas condições de interesse clínico (variáveis nutricionais, hormonais, ambientais e farmacológicas) podem influenciar a excitabilidade neuronal e facilitar (Tabela 1) ou dificultar (Tabela 2) a propagação do fenômeno da DAC.

Tabela 1 – Condições que facilitam a propagação da DAC.

Condição Experimental	Trabalhos - Autor, Ano	Efeitos sobre a DAC
Redução da concentração extracelular de cloreto (lavagem gástrica e administração intramuscular de 3-beta-aminoetil-pirrole)	GUEDES e DO CARMO, 1980	Aumenta a velocidade de propagação Aumenta a incidência de DAC espontânea Aumenta a transferência entre hemisférios
Desnutrição (dieta deficiente em proteína) Deficiência nutricional pela DBR* Condições desfavoráveis de lactação (Ninhadas com 12 filhotes)	GUEDES; ANDRADE; CABRAL-FILHO, 1987 ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; MENDES-DA-SILVA et al., 2014 ROCHA-DE-MELO et al., 2006	Aumenta a velocidade de propagação
Diazepam (5-10 mg/Kg i.v.)	GUEDES et al., 1992; GUEDES e CAVALHEIRO, 1997	Aumenta a velocidade de propagação
Hipoglicemia (Restrição alimentar e injeção de insulina 1,5-3,0 U/Kg)	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991; COSTA CRUZ e GUEDES, 2001	Aumenta a velocidade de propagação
Privação do sono paradoxal (72 h antes do registro eletrofisiológico – técnica do tanque de água)	VASCONCELOS et al., 2004; GUEDES e VASCONCELOS, 2008	Aumenta a velocidade de propagação
Consumo de etanol (3 g/Kg por 7 dias) (3 g/Kg por 18 dias)	GUEDES e FRADE, 1993 ABADIE-GUEDES et al., 2008	Aumenta a velocidade de propagação
Hipertireoidismo (20 µg/Kg i.p. de Tiroxina – T4 por 7 dias)	SANTOS, 2000	Aumenta a velocidade de propagação
Deaferentação sensorial (Remoção das vibrissas do lado direito, P2-3)	TENÓRIO et al., 2009	Aumenta a velocidade de propagação no hemisfério contralateral
Tratamento com L-arginina durante o desenvolvimento (Gavagem: 150, 300 ou 450 mg/Kg/dia, P7-28)	MAIA et al., 2009	Aumenta a velocidade de propagação (dose-dependente)
Tratamento com L-glutamina	LIMA et al., 2009	Aumenta a velocidade de

durante o desenvolvimento (Gavagem: 500 mg/Kg/dia, P7-27)		propagação
Uso de dipirona no início da vida (Gavagem: 300 mg/Kg/dia, por 7 dias, na 2ª, 3ª ou 4ª semana)	AMARAL et al., 2009	Aumenta a velocidade de propagação (principalmente na 4ª semana)
Hipertermia ambiental ($40 \pm 2^\circ\text{C}$, 5 vezes/semana, por 3 semanas, P10-29)	FARIAS-SANTOS et al., 2009	Aumenta a velocidade de propagação
Tratamento crônico com ácido ascórbico (Gavagem: 60 ou 120 mg/Kg/dia, P7-28)	MONTE-GUEDES et al., 2011; MENDES-DA-SILVA et al., 2014	Aumenta a velocidade de propagação Aumenta a amplitude da VLV
Tratamento com o antagonista serotoninérgico Tianeptina (5 ou 10 mg/Kg s.c., P2-24)	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013	Aumenta a velocidade de propagação (dose-dependente)
Tratamento com glutamato monossódico (2 ou 4 g/Kg s.c., P1-14)	LIMA et al., 2013	Aumenta a velocidade de propagação (dose-dependente)
Aumento do influxo extracelular de Ca^{2+} (Uso do ionóforo A23187: 10, 50 ou 100 μM , aplicação tópica)	TORRENTE, et al., 2014b	Aumenta a velocidade de propagação (dose-dependente)
Dexametasona (0,5; 0,3 e 0,1 mg/Kg, P1-3)	LOPES-DE-MORAIS et al., 2014	Aumenta a velocidade de propagação

*Dieta Básica Regional

Tabela 2 – Condições que dificultam a propagação da DAC.

Condição Experimental	Trabalhos - Autor, Ano	Efeitos sobre a DAC
Tratamento com lítio (Adição de carbonato de lítio na dieta: 1,5 g/Kg de dieta) (50 mg/Kg i.p., P75-80)	GUEDES et al., 1989 DE AGUIAR et al., 2011	Diminui a velocidade de propagação, apenas nos animais desnutridos
Hiperglicemia (1 ml, solução 40% de Glicose i.v.) (60 mg/Kg de streptozotocina - STZ i.p.)	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001; COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-	Diminui a velocidade de propagação

	SANTOS; GUEDES, 2006	
Uso de anestésicos (40 mg/Kg i.p. de Thionembutal ou 1g/Kg de Uretana + 40 mg/Kg de Cloralose i.p.)	GUEDES e BARRETO, 1992	Diminui a velocidade de propagação
Hipotireoidismo (8 mg/Kg/dia de Propiltiouracil –PTU, 17º dia de gestação – P42)	GUEDES e PEREIRA-DA-SILVA, 1993	Diminui a velocidade de propagação
Envelhecimento Mongolian Gerbil: 1,5-58 meses Rato albino (Wistar e Sprague-dawley): 2,5-24 meses	GUEDES; AMORIM; TEODÓSIO, 1996; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012	Diminui a velocidade de propagação, independente da espécie, dieta ou descendência
Estimulação ambiental (ambiente enriquecido, incluindo natação)	SANTOS-MONTEIRO; TEODÓSIO; GUEDES, 2000	Diminui a velocidade de propagação
Facilitação da atividade serotoninérgica (5, 10, 20 ou 40 mg/Kg/dia de Fluoxetina s.c., durante lactação; ou aplicação tópica de 5 ou 10 mg/ml)	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006	Diminui a velocidade de propagação (dose-dependente)
Epilepsia crônica (300 mg/Kg i.p. de pilocarpina)	COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006	Diminui a velocidade de propagação
Condições favoráveis de lactação (Redução das ninhadas: 3 filhotes por mãe)	ROCHA-DE-MELO et al., 2006	Diminui a velocidade de propagação
Estimulação elétrica periférica (2 ou 60 Hz, pulsos quadrados de onda; 1,5 ms de duração; 10-40 V intensidade, por 2 eletrodos nas patas esquerdas, P7-28)	DO MONTE-SILVA et al., 2007	Diminui a velocidade de propagação no hemisfério contralateral ao lado corporal estimulado
Pilocarpina (doses subconvulsivantes: 45, 95, 190 mg/Kg i.p., durante registro eletrofisiológico)	GUEDES e VASCONCELOS et al., 2008	Diminui a velocidade de propagação
Tratamento de ratos adultos com triptofano (125 mg/Kg i.p., durante registro eletrofisiológico)	TRINDADE-FILHO; VASCONCELOS; GUEDES, 2009	Diminui a velocidade de propagação
Deficiência, na dieta, de ácidos graxos	BORBA et al., 2010	Diminui a velocidade de

essenciais (5% óleo de coco x controle: 5% óleo de soja, dieta das mães e filhotes até o registro eletrofisiológico)		propagação
Exercício físico em esteira (30 min/dia, 5 dias/semana, 3 semanas: 5, 10, 15 m/min) (30 min/dia, 5 dias/semana, 3 semanas: 5, 10, 15 m/min; 4ª e 5ª semanas: 25 m/min; 45 min em dias alternados)	MONTEIRO et al., 2011, 2015; LIMA et al., 2014 BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012;	Diminui a velocidade de propagação
Eliminação da função ovariana (castração) no início da vida (P7)	ACCIOLY et al., 2012	Diminui a velocidade de propagação Aumenta a amplitude e duração da VLV
Dieta hiperlipídica e hipercalórica (Dieta de cafeteria durante a lactação ou da lactação até P90-93)	GERMANO et al., 2013	Diminui a velocidade de propagação Diminui a amplitude da VLV
Tratamento com o antagonista de opioides Naloxona (10 mg/Kg/dia s.c., P7-28)	GUEDES et al., 2013	Diminui a velocidade de propagação
Tratamento crônico com de ácido ascórbico (Gavagem: 30 mg/Kg/dia, P7-28)	MENDES-DA-SILVA et al., 2014	Diminui a velocidade de propagação
Tratamento com lectina Concanavalina A (1 ou 10 mg/Kg i.p., P5-24)	SOARES et al., 2015	Diminui a velocidade de propagação Aumenta a amplitude e duração da VLV
Tratamento crônico com Taurina e ou alanina (Gavagem: 300 mg/Kg/dia, P7-27 ou P90-110)	FRANSCISCO e GUEDES, 2015	Diminui a velocidade de propagação

Evidências experimentais demonstraram que a deficiência nutricional, especialmente durante o período crítico de desenvolvimento cerebral, altera a ação de determinadas substâncias nesse tecido, diminuindo ou aumentando as respostas ao fenômeno da DAC. Em animais com o estado nutricional comprometido, substâncias como a glicose (COSTA-CRUZ e GUEDES 2001) e a L-arginina (FRAZÃO et al., 2008), afetam a DAC de forma menos intensa, enquanto que a dipirona (AMARAL et al., 2009) e a pilocarpina (VASCONCELOS et al., 2004) a alteram mais intensamente do que o fazem em animais bem-nutridos. Por outro lado, outros compostos, como a fluoxetina (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006) e a glutamina (LIMA et al., 2009) influenciam a DAC de forma semelhante em animais desnutridos e bem-nutridos. Esses achados merecem atenção, pois sugerem uma diferença na reatividade de animais que sofreram desnutrição a determinadas substâncias, o que pode ser útil no uso de determinadas drogas e tratamento de certas doenças.

A desnutrição, seja por manipulação do tamanho da ninhada ou da dieta, aumenta a susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC, facilitando sua propagação nesse tecido (GUEDES et al., 1987; MENDES-DA-SILVA et al., 2014; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). O exercício físico, por sua vez, diminui essa susceptibilidade cortical (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; LIMA et al., 2014; MONTEIRO et al., 2011, 2015).

Em seu estudo inicial, Leão já havia observado o surgimento de ondas “anormais” no registro eletroencefalográfico, durante a DAC, quando a atividade elétrica espontânea se encontra deprimida. 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 ECoG (LEÃO, 1944a). Isto poderia sugerir uma relação entre a DAC e fenômenos que indicam alteração da excitabilidade cerebral, como a potenciação de longa duração (LTP; do inglês “long term potentiation”), como confirmam as evidências expostas a seguir.

2.3 Potenciação da atividade elétrica Cerebral

A Potenciação de longa duração (LTP) é um fenômeno neural, caracterizado por um aumento na magnitude das respostas pós-sinápticas durante horas, dias ou semanas, após

breve estimulação repetitiva de aferentes pré-sinápticos. Ou seja, é um aumento de longa duração na eficácia sináptica (plasticidade neuronal), possivelmente associado com os processos de aprendizagem e memória (IZQUIERDO et al., 2008; MALENKA, 2003; NICOLL e ROCHE, 2013; TEYLER E DISCENA, 1984;).

Esse fenômeno foi observado inicialmente no hipocampo e continua a ser estudado mais facilmente nessa região do cérebro, sendo utilizado como modelo em estudos de plasticidade sináptica (ANWYL, 2009; MALENKA, 2003;). Os estudos iniciais ocorreram no começo da década de 1970, quando Timothy Bliss e colaboradores na Inglaterra, descobriram que uns poucos segundos de estimulação elétrica de alta frequência podiam aumentar a transmissão sináptica no hipocampo do coelho por dias ou mesmo semanas. No entanto, a LTP também ocorre em outras regiões do encéfalo, incluindo o córtex, a amígdala e o cerebelo (PURVES et al., 2005).

Após a LTP, devido à ativação precoce de uma variedade de glico e sialoglicoproteínas, muitas proteínas são sintetizadas na região CA1 do hipocampo. Estas proteínas podem moldar mudanças morfológicas nos terminais dendríticos e/ou terminais do axônio que fazem sinapses com elas (FOLEY, et al., 2003; ROSE, 1995). Essas mudanças foram sugeridas como a base da manutenção da LTP e memória (BOZON et al., 2003; KANDEL e SQUIRE, 2000; LYNCH; REX; GALL, 2007) e sugerem um realce na eficácia sináptica. Embora muitos avanços tenham ocorrido no intuito de explicar seus mecanismos de indução e expressão, os fatores responsáveis pelo aumento de longa duração da eficácia sináptica ainda precisam ser esclarecidos (ANWYL, 2009).

Evidências experimentais sugerem que a DAC pode modular a excitabilidade neural e atividade sináptica, com possíveis implicações para potenciação de longa duração. Foi demonstrado “in vitro” (fatia de neocórtex de rato) que após uma onda de DAC ocorria um aumento na amplitude de potenciais elétricos extracelulares evocados eletricamente, com características semelhantes à LTP (FOOTITT e NEWBERRY, 1998). A ocorrência dessa associação (DAC seguida de potenciação) foi demonstrada, “in vivo”, pela primeira vez, no teto óptico de rã (GUEDES; TSURUDOME; MATSUMOTO, 2005). Mais recentemente, Faraguna et al., (2010) evidenciaram em ratos, “in vivo”, que a indução da DAC aumentou respostas evocadas cortico-corticais, sugerindo uma potenciação sináptica após indução local da DAC. Corroborando esses achados, demonstramos “in vivo” que a DAC induz uma potenciação do ECoG, em ratos machos, sob efeito de agentes anestésicos (LOPES-DE-

MORAIS et al., 2014; SOUZA et al., 2011) e em ratos acordados, sem o efeito de anestesia (SOUZA et al., 2015).

LTP é um fenômeno induzido experimentalmente, que pode ser usado para demonstrar o repertório de modificações de longa duração dos quais sinapses individuais são capazes (MALENKA e BEAR, 2004). No córtex, a LTP tem se mostrado dependente da entrada de cálcio pela ativação de receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (BEAR e KIRKWOOD, 1993). Na região CA3 do hipocampo, essa exigência não é requerida (IZQUIERDO et al., 2008). A DAC por si só induz despolarização prolongada, ativação dos canais de NMDA, elevação de cálcio intracelular e potássio extracelular (SOMJEN et al., 1992). Deste modo, Footitt & Newberry (1998) não se surpreenderam pelo fato da DAC ter induzido uma potenciação semelhante à LTP “in vitro”.

Além disso, esse realce da eficácia sináptica é classicamente induzido por uma breve estimulação de alta frequência “in vivo” e “in vitro”, mas também pode ser induzido por uma breve exposição ao KCl – o que igualmente pode desencadear a DAC (IZQUIERDO et al., 2008).

É importante citar também que, foi demonstrado, “in vitro”, em tecido cortical humano, um aumento da atividade epileptiforme associado à DAC (GORJI & SPECKMANN, 2004), bem como um aumento na indução da LTP, indicando que a DAC facilita a eficácia e excitabilidade sináptica nesse tecido (BERGER et al., 2008).

Todas essas evidências sugerem que a DAC pode potenciar a atividade elétrica cerebral, provavelmente por modificações na plasticidade sináptica. Outro fator que tem mostrado benefícios na função cerebral, com implicações na sua plasticidade, é a prática de exercício físico, como mostram as evidências expostas a seguir.

2.4 Exercício Físico

A atividade física é todo movimento produzido pelos músculos esqueléticos com gasto energético maior que a taxa metabólica basal. Por outro lado, o exercício físico é considerado como uma sequência sistematizada de movimentos de diferentes segmentos corporais, executados de forma planejada e com um determinado objetivo a ser atingido. Por exemplo: um passeio ao ar livre é considerado uma atividade física, enquanto uma caminhada orientada é um exercício físico (Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte). Por sua vez, o

enriquecimento ambiental é a criação de condições que oferecem uma oportunidade maior de praticar exercícios físicos, interações sociais e experiências de aprendizagem (VAN PRAAG; KEMPERMANN; CAGE, 2000). Os avanços da ciência com relação a esse tema são inúmeros, e isso tem trazido benefícios para a saúde, longevidade e qualidade de vida (FRAGA e VARELA, 2012).

Nos últimos anos, a relação entre nutrição, exercício físico e estado de saúde dos indivíduos vem recebendo atenção crescente da comunidade científica. Diversos estudos têm demonstrado que o exercício físico melhora a função cardiovascular, o bem estar físico, psicológico e pode atenuar os déficits neurais associados ao envelhecimento. Além disso, ajuda na prevenção ou controle de várias condições específicas como: obesidade, diabetes, níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, estresse e auxilia no tratamento de várias enfermidades mentais, incluindo ansiedade e depressão, (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; COURNEYA; KEATS; TURNER, 2000; FADAEI; GORJI; HOSSEINI, 2015; LATIMER et al., 2011; LECKIE et al., 2014; STEELE et al., 2008; VERÍSSIMO et al., 2002;).

Evidências científicas demonstram que a exposição ao enriquecimento ambiental, que inclui uma oportunidade maior de exercícios físicos, tem produzido efeitos positivos sobre o SNC e podem melhorar o desenvolvimento e função do cérebro ao longo da vida (GUENDLER et al., 2008; VEDOVELLI et al., 2011).

Inúmeros relatos sugerem que o exercício e atividade física regular podem reduzir o risco de comprometimento neurológico em condições como esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, doença de Parkinson (COTMAN e BERCHTOLD, 2002; ELDAR e MARINCEK, 2000; SMITH e ZIGMOND, 2003; SOSNOFF et al., 2013). Além disso, o exercício físico pode melhorar a qualidade de vida de pessoas com epilepsia; trazendo benefícios como melhora nos parâmetros físicos e saúde mental, integração social, e até redução do número de crises (PIMENTEL; TOJAL; MORGADO, 2015).

Evidências experimentais, em animais (VAN PRAAG et al., 2005) e em humanos (HILLMAN, 2004), têm associado o exercício com a melhora da função cognitiva, aprendizagem e memória. Progressos induzidos pelo exercício na aprendizagem e memória têm sido diretamente associados com a melhora na neurogênese, aumento na plasticidade sináptica dependente da atividade física e expressão gênica alterada (MORA; SEGOVIA; DEL ARCO, 2007; O'CALLAGHAN; OHLE; KELLY, 2007).

Alguns estudos demonstraram efeitos benéficos do exercício de natação sobre as funções cerebrais. Este exercício, durante a gravidez promove aumento da proliferação celular

no hipocampo, aliviando assim a perda da função de memória associada à gestação (KIM et al., 2012)., A natação também é capaz de aliviar os sintomas de déficit de atenção e hiperatividade em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) utilizados como modelo animal do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD), um distúrbio neurocomportamental caracterizado por desatenção, hiperatividade e impulsividade (KO et al., 2013). O exercício regular de natação pode ser um método para melhorar algumas das consequências comportamentais deletérias da dependência de morfina, reduzindo sua gravidade e consumo voluntário, com redução da ansiedade e depressão em ratos (FADAEI; GORJI; HOSSEINI, 2015).

Estas mudanças em circuitos neurais têm sido associadas com alterações nos fatores neurotróficos centrais em várias áreas do cérebro (FANG et al., 2013; GOMEZ-PINILLA et al., 2002; LEE et al., 2006; NEEPER et al., 1995; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004), especialmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), um importante regulador da plasticidade sináptica cerebral (ROTHMAN e MATTSON, 2013).

LEE et al. (2006), demonstraram que ratas que realizaram natação durante a gestação, apresentaram filhotes, cujos hipocampus estavam com expressão de RNAm aumentada para o BDNF, o que está relacionado com neurogênese hipocampal e aprimoramento da memória de curta duração.

O'Callaghan et al. (2007) evidenciaram em ratos, que a corrida forçada em esteira resultou em melhorias seletivas na plasticidade do hipocampo. Nesse trabalho, os animais que foram submetidos a treinamento físico demonstraram maior expressão de potenciação de longa duração no giro dentado e tiveram um maior aprendizado na tarefa de reconhecimento de objeto. Essas mudanças foram associadas com um aumento na expressão do BDNF no giro dentado.

Santos-Monteiro et al. (2000) averiguaram a influência da estimulação sensorial, associada ao estado nutricional, sobre a DAC em ratos. Observou-se que apenas os animais desnutridos, que foram mantidos em condições de ambientes ricos em estímulos (inclusive natação), desde a idade pré-desmame até a idade adulta (dos 7 aos 90-110 dias de idade), apresentaram redução significativa da velocidade de propagação da DAC. Os grupos desnutridos e submetidos à estimulação ambiental apenas após o desmame não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo desnutrido não estimulado. Isso sugere que há um efeito diferencial da estimulação ambiental sobre a DAC, dependendo do estado nutricional e do período em que a estimulação se inicia.

Sabe-se que o SNC pode alterar sua estrutura e função como resultado da interação dos indivíduos com o ambiente (REAL et al., 2015). Assim, é de grande relevância investigar como o exercício pode regular benéficamente a neuroplasticidade no início da vida, e ou em fases mais tardias. Apesar de serem bem documentados os efeitos do exercício físico sobre o SN em animais adultos, pouco se sabe acerca de seus efeitos no cérebro em desenvolvimento. Como foi mencionado anteriormente, estímulos no período inicial da vida podem afetar a integridade funcional do cérebro na fase adulta. Além disso, em ambos os períodos (fase inicial da vida pós-natal e fase adulta), são escassos os estudos sobre a influência do exercício físico, em associação com uma deficiência nutricional, sobre a potenciação da atividade elétrica cerebral induzida pela DAC no córtex cerebral.

Nesse trabalho usamos a “natação livre” como fator adicional à manipulação das “condições do aleitamento”, para investigar os efeitos desse exercício realizado no início da vida ou em uma fase mais tardia, e os possíveis efeitos da interação desses fatores sobre a eletrofisiologia do córtex cerebral (potenciação do ECoG pós-DAC).

A escolha da natação para este estudo, como um modelo de exercício em ratos, foi baseada em três razões principais: primeiro, os efeitos positivos da natação sobre o funcionamento do cérebro estão bem estabelecidos (KO et al., 2013; ZHONG et al., 2016); segundo, apesar disso, pouco se sabe sobre a influência da natação sobre o aumento da atividade elétrica do cérebro induzida pela DAC no córtex cerebral; terceiro, o exercício de natação apresenta vantagens sobre o exercício em esteira, uma vez que a natação é uma habilidade natural dos ratos, o que evita a seleção de animais, que é necessária em protocolos experimentais utilizando esteira. Além disso, tem a vantagem de não causar lesões nas patas ou cauda, de modo que não é fisicamente traumatizante para o animal (KEVIN et al., 2006).

3 – PERGUNTA CONDUTORA

A natação precoce e/ou tardia pode influenciar o efeito de potenciação da atividade elétrica cerebral pós-DAC? Uma condição desfavorável de lactação associada à natação poderia também modular este efeito?

4 – HIPÓTESES

- O exercício de natação influencia o efeito de potenciação da atividade elétrica cerebral pós-DAC;
- A condição desfavorável de lactação interage com o exercício de natação e modula esse efeito;
- Períodos diferentes de realização do exercício exibem efeitos diferentes sobre a potenciação do ECoG pós-DAC.

5 – OBJETIVOS

5.1 – Geral

Investigar a influência de diferentes períodos de natação sobre a capacidade da DAC, em potencializar a atividade elétrica cerebral, em ratos machos adultos, previamente submetidos a condições favoráveis (Grupo L₆) ou desfavoráveis (Grupo L₁₂) de lactação.

5.2 – Específicos

- Acompanhar a evolução ponderal ao longo do desenvolvimento, como indicador do estado nutricional;
- Quantificar a amplitude da atividade elétrica cortical antes e após a DAC e compará-las, como forma de demonstrar o efeito de potenciação;
- Ao final do registro eletrofisiológico, avaliar o peso cerebral, como indicador de efeitos da restrição nutricional sobre o desenvolvimento do cérebro;
- Analisar possíveis diferenças e interações entre os efeitos eletrofisiológicos dos dois períodos de natação (precoce e tardia) em animais submetidos às condições favoráveis ou desfavoráveis de lactação.

6 – MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT), do Departamento de Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os procedimentos experimentais a seguir descritos foram previamente submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.017295/2012-17 – ANEXO A). Foram seguidas as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e as normas estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Bethesda, USA).

6.1 – Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Esses animais foram mantidos durante todo o experimento em gaiolas de polipropileno (51 cm x 35,5 cm x 18,5 cm), em salas com temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas (início da fase clara às 6:00h). A dieta de manutenção das mães até o final do aleitamento e dos filhotes (estes últimos após o desmame, que ocorreu aos 21 dias de vida), foi a dieta comercial padrão do biotério (Presence Ratos e Camundongos – Purina do Brasil Ltda.; com 23% de proteína). Todos receberam quantidades de água e dieta suficientes para garantir o consumo “*ad libitum*” e foram criados utilizando-se dos procedimentos rotineiros do biotério até atingirem a idade em que foram submetidos aos registros eletrofisiológicos (entre 90 e 120 dias de idade).

6.2 - Determinações ponderais

Os pesos corporais foram aferidos com auxílio de uma balança eletrônica da marca Filizola (capacidade de 3,0 Kg e escala em divisão de 0,5g), aos 7, 21, 30, 60 e 90 dias de vida pós-natal.

Após o procedimento de eutanásia, o encéfalo foi retirado mediante 2 incisões: uma anterior, no limite entre os hemisférios cerebrais e o bulbo olfatório, excluindo-o; e outra, realizada posteriormente, tangenciando a borda inferior do cerebelo, incluindo-o. O encéfalo foi pesado, utilizando-se uma balança analítica (modelo Bosh, S-2000, com sensibilidade de até 0,1mg).

6.3 - Exercício Físico

6.3.1 Natação Precoce

A natação em fase inicial da vida (aqui denominada natação precoce) foi realizada do 8º ao 23º dias de vida pós-natal. Nesse período, alguns filhotes foram marcados aleatoriamente e submetidos a um programa constituído de sessões diárias de natação livre (GUENDLER et al., 2008). Esses filhotes foram submetidos à natação, sem resistência adicional nas patas, sempre no mesmo horário (entre 8:00 e 12:00 horas da manhã). A água foi previamente aquecida e mantida a uma temperatura de $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, numa caixa plástica medindo 33x40x17cm. O nível da água foi mantido de acordo com o crescimento dos animais de forma que não permitisse o toque das patas no fundo do recipiente. Inicialmente, foi realizada uma adaptação dos animais ao ambiente aquático. Para isso, os mesmos foram ambientados durante 3 dias na proporção de 2, 5 e 10 minutos respectivamente. Essa adaptação ocorreu aos 8º, 9º e 10º dias de vida. Os animais descansaram no 11º e 12º dias e a partir do 13º ao 17º nadaram progressivamente 15, 20, 25, 30 e 40 minutos/dia, descansando no 18º e 19º dias e do 20º ao 23º dias nadaram 40 minutos/dia. Após cada sessão de natação, os animais foram enxugados, aquecidos e devolvidos à companhia materna.

6.3.2 Natação Tardia

Um outro grupo de animais, escolhido aleatoriamente, foi submetido do 60º ao 75º dia de vida pós-natal, ao mesmo programa de natação livre utilizado para o grupo de natação precoce (GUENDLER et al., 2008), diferindo apenas com relação aos dias de realização do exercício e ao recipiente plástico utilizado como tanque de natação, que mede 50 cm de diâmetro e tem capacidade para 50 litros. A adaptação ocorreu aos 60º, 61º e 62º dias de vida, com os animais nadando 2, 5 e 10 minutos respectivamente. Os animais descansaram no 63º e 64º dias e a partir do 65º ao 69º nadaram progressivamente 15, 20, 25, 30 e 40 minutos/dia, descansando no 70º e 71º dias e do 72º ao 75º dias nadaram 40 minutos/dia. Após cada sessão de natação, os animais foram enxugados, aquecidos e devolvidos às suas gaiolas no biotério.

6.3.3 Grupos Controle para o exercício

Os quatro grupos controle não-exercitados (dois ‘precoces’ e dois ‘tardios’), nas idades e condições de lactação correspondentes às dos grupos exercitados, foram colocados no mesmo tanque dos animais que nadaram, durante o mesmo tempo diário, porém o nível da água foi mantido baixo, possibilitando que eles tocassem as patas no fundo do recipiente. Dessa forma, foram submetidos ao mesmo tipo de estresse aquático sem, contudo realizar o esforço físico da natação.

6.4. Procedimento cirúrgico e Registro Eletrofisiológico

Quando os filhotes atingiram 90 a 120 dias de idade, foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p.), com uma solução de Uretana 10% + Cloralose 0,4%, à dose de 1000mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose (correspondente à administração de 1ml da solução por 100g de peso corpóreo).

Em seguida, a cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico modelo 900 (David Kopf), permitindo então a incisão da pele e remoção do periósteo para exposição

do crânio. Neste, foram trepanados três orifícios, ao nível do hemisfério cerebral direito, alinhados na direção fronto-occipital e paralelamente à linha média. O primeiro orifício (2mm de diâmetro), situado no osso frontal, foi utilizado para estimulação com cloreto de potássio (KCl) a 2%, necessária para deflagrar a DAC. Os outros dois orifícios (2-3mm de diâmetro), situados no osso parietal, designados proximal (p) e distal (d), serviram para registrar, por 4 horas, o ECoG e a VLV na superfície cortical, conforme será descrito abaixo.

Os registros eletrofisiológicos foram realizados em um sistema digital de registro (Biopac MP 100, USA ou Biopac MP150, USA). O animal foi mantido sobre um aquecedor elétrico a fim de que a temperatura retal se mantivesse estável ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), sendo ajustada quando necessário. Para o registro, foram utilizados três eletrodos do tipo “prata-cloreto de prata”, preparados no laboratório por eletrólise, processo no qual se produz a deposição de uma fina camada de cloreto de prata sobre um fio do mesmo metal, como descrito previamente (GUEDES e BARRETO, 1992). Após isso, os fios foram imersos em pipetas cônicas de polietileno (com 5cm de comprimento e com pontas de 0,5 mm de diâmetro interno), preenchidas com solução de Agar Ringer à 1% (LIMA et al., 2014). Um par dessas pipetas, já fixadas entre si e com distância entre as suas pontas conhecida (variando entre 4 e 6 mm) foi colocado em contato com a superfície cortical, para o registro eletrofisiológico; um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre os ossos nasais e usado como eletrodo de referência comum.

As duas primeiras horas do registro, que constituem o Período Inicial, transcorreram sem que a DAC fosse deflagrada. Após este período, e mantendo-se o mesmo ganho dos amplificadores, a DAC passou a ser deflagrada, a cada 30 minutos, pela estimulação, durante 1 minuto, com KCl a 2% (aproximadamente 270 mM), e o ECoG, bem como a VLV que acompanha a DAC, foram registrados por mais 2h (Período Final). As amplitudes do ECoG antes e após a presença da DAC, foram comparadas como base para analisar a ocorrência da potenciação da atividade elétrica espontânea. Todos os dados de cada animal, referentes à evolução ponderal, registro da DAC e amplitudes do ECoG foram anotados no Protocolo do Animal (APÊNDICE A). Na figura 3 encontra-se esquema do registro eletrofisiológico da DAC.

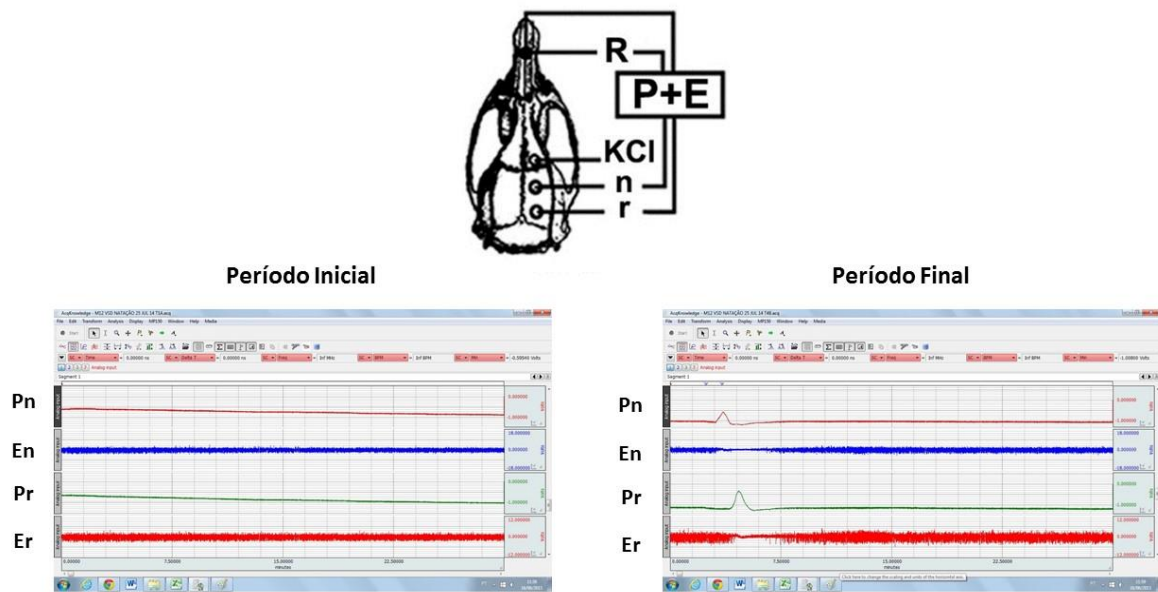


Figura 3– Esquema do registro eletrofisiológico da DAC. Na parte superior, desenho do crânio de um rato com a representação da posição do eletrodo de referência comum (**R**) nos ossos nasais e dos três orifícios necessários ao experimento. Na região frontal, o local de aplicação de **KCl** para provocar a DAC, e na região parietal, os pontos de registro proximal (near – **n**) e distal (remote – **r**), que servem para registrar, por 4 horas, o ECoG (**E**) e a VLV (**P**) na superfície cortical. Na parte inferior, trechos representativos de um registro eletrofisiológico, a partir de um sistema digital de registro (Biopac MP 100, USA ou Biopac MP150, USA). Os traçados identificados com **Pn** e **Pr** referem-se à variação lenta de voltagem (VLV), que acompanha a Depressão Alastrante Cortical (DAC) e os traçados identificados com **En** e **Er** correspondem ao eletrocorticograma. Estão identificados o **Período Inicial** (período em que não há deflagração da DAC) e o **Período Final** (período em que há estimulação com KCl 2% para deflagração da DAC). O ponto cortical de registro **n** (mais próximo do ponto de estimulação) e o ponto cortical **r** também são indicados no registro. As marcas, logo acima do traçado **Pn**, no Período Final, indicam o intervalo em que a estimulação com KCl foi aplicada na região frontal do hemisfério direito para elicitar a DAC.

6.5. Eutanásia

Ao final de cada sessão de registro eletrofisiológico, estando o animal ainda anestesiado, foi introduzida uma agulha na região bulbar, através da cisterna magna, provocando-se lesão dos centros de controle cardiorrespiratórios, com imediata parada da respiração, seguida por parada cardíaca.

6.6. Grupos experimentais

No dia do nascimento, animais provenientes de várias ninhadas nascidas no mesmo dia, foram reunidos e distribuídos aleatoriamente, para constituir os dois seguintes grupos:

Grupo L₆: filhotes submetidos a condições favoráveis de lactação (ninhadas com 6 filhotes).

Grupo L₁₂: filhotes submetidos a condições desfavoráveis de lactação (ninhadas com 12 filhotes). Neste caso, o estado nutricional dos filhotes lactentes foi prejudicado pela maior competição pelo leite materno, decorrente do maior número de filhotes nessas ninhadas, em relação ao grupo L₆, como previamente descrito (DE LUCA; CIOFFI; BURES, 1977; MAIA et al., 2006; ROCHA-DE-MELO et al., 2004, 2006; TONKISS; COHEN; SPARBER, 1988). Embora a qualidade do leite seja mantida, há um prejuízo na quantidade ofertada a cada filhote (MORGANE et al., 1978).

Cada um dos dois grupos citados, por sua vez, originou quatro subgrupos, sendo dois submetidos à natação (precoce ou tardia) e os outros dois foram os seus respectivos controles não-exercitados.

Além dos grupos citados acima, com a finalidade de excluir o fator “tempo de registro” como responsável pela potenciação do ECoG pós-DAC, foram adicionados seis grupos, nos quais foram realizados registros da atividade elétrica cerebral espontânea, durante 4 horas, sem eliciação da DAC. Na Tabela 3 encontra-se a representação esquemática dos grupos estudados, resultantes da combinação das duas condições de lactação, do período da natação, da realização ou não da mesma, e da presença ou não da DAC no registro eletrofisiológico.

Com relação aos grupos adicionais (sem deflagração da DAC), foram realizados inicialmente os registros dos grupos exercitados e não-exercitados no período precoce (L₆ e L₁₂). Como não houve diferença nos resultados das amplitudes do ECoG em nenhum dos grupos, nos animais que realizaram o exercício no período Tardio só foram acrescentados grupos controle, com registros com 4 horas sem deflagração da DAC para os grupos exercitados (L₆ e L₁₂), uma vez que a natação realizada nesse período poderia ter efeito sobre as amplitudes do ECoG, independentemente da DAC.

Tabela 3 - Descrição dos grupos experimentais, de acordo com a condição de lactação e exercício, bem como da presença ou ausência da depressão alastrante.

Grupo	Condição de lactação	Período do exercício	Condição de exercício	Deflagração da DAC
1 (n=12)	L ₆	Precoce	Não-exercitado	Sim
2 (n=16)	L ₆	Precoce	Exercitado	Sim
3 (n=15)	L ₁₂	Precoce	Não-exercitado	Sim
4 (n=13)	L ₁₂	Precoce	Exercitado	Sim
5 (n=13)	L ₆	Tardio	Não-exercitado	Sim
6 (n=13)	L ₆	Tardio	Exercitado	Sim
7 (n=10)	L ₁₂	Tardio	Não-exercitado	Sim
8 (n=9)	L ₁₂	Tardio	Exercitado	Sim
9 (n=9)	L ₆	Precoce	Não-exercitado	Não
10 (n=10)	L ₆	Precoce	Exercitado	Não
11 (n=9)	L ₁₂	Precoce	Não-exercitado	Não
12 (n=7)	L ₁₂	Precoce	Exercitado	Não
13 (n=8)	L ₆	Tardio	Exercitado	Não
14 (n=12)	L ₁₂	Tardio	Exercitado	Não

L₆ = animais submetidos a condições favoráveis de lactação (ninhadas com 6 filhotes); L₁₂ = animais submetidos a condições desfavoráveis de lactação (ninhadas com 12 filhotes). Período Precoce = 8º ao 23º dias de vida pós-natal; Período Tardio = 60º ao 75º dia de vida pós-natal.

6.7. Análise quantitativa dos sinais elétricos corticais

Do sinal do ECoG foram analisadas amostras de aproximadamente 10 minutos, em quatro pontos temporais do registro eletrofisiológico: dois no Período Inicial e outros dois no Período Final. Essas amostras foram analisadas, off-line, com o auxílio de um algoritmo implementado no *software* MATLABTM, versão R2011b, que calcula suas amplitudes médias.

A partir desses valores procedeu-se a etapa de normalização dos dados, realizada em relação ao menor valor das amplitudes. Para cada animal, os valores das amplitudes do ECoG foram normalizados, expressos em unidades relativas e comparados, no mesmo animal, antes e após a DAC, como base para analisar a ocorrência da potenciação da atividade elétrica espontânea (SOUZA et al., 2011, 2015).

6.8. Análise Estatística

As diferenças de amplitude intra-grupos na atividade elétrica cortical espontânea (amplitudes antes, *versus* depois da DAC) foram analisadas estatisticamente por meio do Teste t pareado de Student. As diferenças inter-grupos (amplitudes do ECoG, pesos corporais e cerebrais) foram analisadas por meio da Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, incluindo como fatores “condição de lactação” (L₆ and L₁₂) e “exercício” (exercitado e não-exercitado). A ANOVA foi seguida do teste *post hoc* de Holm-Sidak, quando indicado. Foram aceitas como significantes as diferenças em que $p < 0,05$.

7 – RESULTADOS

Os resultados da pesquisa encontram-se apresentados em forma de artigo, os quais estão dispostos nos Apêndices B e C. Estes resultados estão descritos em dois artigos originais, submetidos para publicação em revistas internacionais, que publicam artigos na área da Neurociência. O primeiro artigo (APÊNDICE B) intitulado “Early swimming exercise differentially modulates electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats previously suckled in different litter sizes”, foi submetido à publicação na Revista Neuroscience Letters, que é classificada como qualis internacional B1 pela Capes, com fator de impacto de 2,030 (ANEXO B). O segundo artigo (APÊNDICE C) intitulado “Swimming exercise in adult rats that were previously suckled under different litter sizes: effects on the electrocorticogram potentiation after spreading depression”, foi submetido à publicação na Revista Brain Research, que é classificada como qualis internacional A2 pela Capes, com fator de impacto de 2,843 (ANEXO C).

8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados dessa tese, conduzem às seguintes conclusões:

- Nossos dados confirmam a existência da potenciação do eletrocorticograma induzida pela DAC, conforme demonstramos anteriormente;
- Animais submetidos ao exercício de natação no início da vida pós-natal (8-23 dias) apresentam redução na potenciação do ECoG pós-DAC;
- Os efeitos da natação precoce e da deficiência nutricional (grupo L₁₂) sobre a potenciação do ECoG são de longa duração (uma vez que esses fatores ocorreram no início da vida e o registro eletrofisiológico na fase adulta), sugerindo uma ação de plasticidade cerebral;
- Animais submetidos ao exercício de natação na fase adulta (60-75 dias) apresentam aumento na potenciação do ECoG pós-DAC;
- Os pesos corporais e cerebrais inferiores do grupo L₁₂ em relação ao L₆ corroboram outros estudos, confirmando que a técnica de manipulação do tamanho das ninhadas foi eficaz em alterar negativamente o estado nutricional dos animais, com repercussões permanentes nos parâmetros de peso corporal e cerebral;
- A deficiência nutricional (grupo L₁₂) atenua o efeito do exercício de natação (precoce e tardia) sobre a potenciação do ECoG associada a DAC, sugerindo uma interação entre os dois fatores;
- O efeito de potenciação nas amplitudes do ECoG não pode ser atribuído ao fator tempo de registro, mas sim à ação da DAC no tecido cortical, visto que nos grupos que não sofreram DAC, não foi observado aumento nas amplitudes do ECoG durante as 4 horas de registro.

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

- Verificar os efeitos do exercício de natação sobre a memória de reconhecimento de objetos, como correlato comportamental dos efeitos eletrofisiológicos encontrados neste estudo;
- Investigar os efeitos de outras modalidades de exercício forçado (corrida em esteira, por exemplo) sobre a potenciação da atividade elétrica cortical associada à DAC;
- Comparar os efeitos eletrofisiológicos do exercício forçado com aqueles do exercício voluntário (em “rodas de atividade”) sobre a potenciação do ECoG após a DAC;
- Estudar os efeitos da redução do tamanho das ninhadas (para 3 filhotes) sobre a potenciação da atividade elétrica cortical após a DAC;
- Investigar os efeitos do envelhecimento sobre a potenciação associada à DAC, comparando animais jovens e idosos.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES R.; SANTOS S.D.; CAHÚ T.B.; GUEDES R.C.A.; BEZERRA R.S.
Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.32, n.8, p.1417-1421, 2008.
- ACIOLY, N.E., BENEVIDES, R.D.L., COSTA, B.L.S.A., GUEDES, R.C.A. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, p. 405-410, 2012.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.S.S.; GERMANO, P.C.P.S.; NEGRÃO, Y.D.S.; GUEDES, R.C.A. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 70-75, 2013.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, P.C.F; LIMA, D.S.C; OZIAS, M.G; OLIVEIRA, M.B; GUIMARÃES, N.X; GUEDES, R.C.A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, n.2, p.275-282, 2006.
- 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: dipyrene enhances spreading depression in rats. **Experimental Neurology**, v. 219, p.492-498, 2009.
- ANWYL, R. Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 735–740, 2009.
- ALAMY, M.; BENGELLOUN, W.A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1463-1480, 2012.
- 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, p. 271-286, 1989.
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A.A.C.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; GUEDES R.C.A. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 452–457, 2012.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Caderno Saúde Pública**, v.19 (Suppl 1), p. 181-91, 2003.
- BEAR, M.F.; KIRKWOOD, A. Neocortical long-term potentiation. **Current Opinion in Neurobiology**, 1993.
- BÉGHIN, I. Abordagem causal em nutrição. In: GOUVEIA, E. L. C. org. **Nutrição, Saúde & Comunidade**, Rio de Janeiro: Revinter, p. 181-193, 1990.
- BELLUSCIO, L.M.; BERARDINO, B.G.; FERRONI, N.M.; CERUTI, J.M.; CÁNEPA, E.T. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiology & Behavior**, v.129, p. 237-254, 2014.
- BERCHICCI, M; LUCCI, G; DI RUSSO, F. Benefits of Physical Exercise on the Aging Brain: The Role of the Prefrontal Cortex. **The Journals of Gerontology A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n.11, p. 1337-1341, 2013.
- BERGER, M.; SPECKMANN, E.-J.; PAPE, H.; GORJI, A. Spreading depression enhances human neocortical excitability *in vitro*. **Cephalalgia**, v. 28, p.558–562, 2008.
- BISCEGLI, T.S.; POLIS, L.B.; SANTOS, L.M.; VICENTIN, M. Avaliação do estado nutricional e do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças frequentadoras de creche. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 4, n. 25, p 337-42, 2007.

- BORBA, J. M.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; DOS SANTOS, A. A.; DA COSTA, B. L.; DA SILVA, R. P.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 144-50, 2010.
- 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. **Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, v. 358, p. 805-814, 2003.
- CABRAL, F.R.; PRIEL, M.R.; ARAUJO, B.H.S.; TORRES, L.B.; LIMA, E.; VALE, T.G.; PEREIRA, F.; AMORIM, H.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCERNI, D.A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Malnutrition in Infancy as a Susceptibility Factor for Temporal Lobe Epilepsy in Adulthood Induced by the Pilocarpine Experimental Model. **Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 469–478, 2011.
- CHARLES, A.C.; BACA, S.M. Cortical spreading depression and migraine, **Nature Reviews Neurology**, v. 9, p. 637-644, 2013.
- COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 295-301, 2002.
- COSTA-CRUZ, R.R.G.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 303, p. 177-180, 2001.
- COSTA-CRUZ, R.R.G.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 271-275, 2006.
- COURNEYA, K.S.; KEATS, M.R.; TURNER, R. Physical exercise and quality of life in cancer patients following high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. **Psycho-Oncology**, v.9, p.127-136, 2000.
- DE AGUIAR, M.J.; DE AGUIAR, C.R.; GUEDES, R.C. Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats. **Nutr Neurosci**. v. 14, n. 4, p. 159-64, 2011.
- DE LUCA, B.; CIOFFI, L.A.; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Activitas Nervosa Superior**, v.2, n. 12, p. 130-131, 1977.
- DOHMEN, C.; SAKOWITZ, O.W.; FABRICIUS, M. et al. Co-Operative Study of Brain Injury Depolarizations (COSBID). Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. **Annals of Neurology**; v.63, p. 720-728, 2008.
- DOBBING, J.; SMART, J.L. Vulnerability of developing brain and behavior. **British Medical Bulletin**, v.2, n. 30, p. 164-168, 1974.
- DO MONTE-SILVA, K.K.; ASSIS, F.L.; LEAL, G.M.; GUEDES, R.C.A. 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, 2007.
- DREIER, J.P.; MAJOR, S.; PANNEK, H.W.; WOITZIK, J.; SCHEEL, M.; WIESENTHAL, D.; MARTUS, P.; WINKLER, M.K.; HARTINGS, J.A.; FABRICIUS, M.; SPECKMANN, E.J.; GORJI, A. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. **Brain**, v. 35 (Pt 1), p. 259–275, 2012.
- DREIER, J. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nature Medicine**, v. 17, p. 439–447, 2011.
- DHUTIA, H., SHARMA, S. Playing it safe: exercise and cardiovascular health. **Practitioner**, v. 259 (1786), p. 15-20, 2015.

- ELDAR, R.; MARINCEK, C. Physical activity for elderly persons with neurological impairment: a review. **Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 32, p. 99-103, 2000.
- FABRICIUS, M.; FUHR, S.; WILLUMSEN, L.; DREIER, J.P; BHATIA R.; BOUTELLE, M.G.; HARTINGS, J.A; BULLOCK, R.; STRONG, A.J.; LAURITZEN, M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, p. 1973–1984, 2008.
- FADAEI, A.; GORJI, H.M.; HOSSEINI, S.M. Swimming reduces the severity of psychological dependence and voluntary morphine consumption in morphine dependent rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 747, p. 88-95, 2015.
- FANG, Z.H.; LEE, C.H.; SEO, M.K.; CHO, H.; LEE, J.G.; LEE, B.J.; PARK, S.W.; KIM, Y.H. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. **Neuroscience Research**, v. 9, p. 168-0102, 2013.
- FARAGUNA, U.; NELSON, A.; VYAZOVSKIY, V.V.; CIRELLI, C.; TONONI, G. Unilateral cortical spreading depression affects sleep need and induces molecular and electrophysiological signs of synaptic potentiation in vivo. **Cerebral Cortex**, v. 20, p. 2939-2947, 2010.
- FARIAS-SANTOS, R.C.; LIRA, M.C.A.; PEREIRA, D.E.; SÁ, I.R.; PIMENTEL, M.R.F.; ARAÚJO, L.L.; GUEDES, R.C.A. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. **Neuroscience Letters**, v. 454, p. 218-222, 2009.
- FERRARI, M.D.; KLEVER, R.R.; TERWINDT, G.M.; AYATA, C.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.M.J.M. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. **Lancet Neurol**, v. 14, p. 65-80, 2015.
- FIFKOVA, E. BURES, J.; KOSHTOYANTS, O.K.H.; KRIVÁNEK, J.; WEISS, T. Leão's spreading depression in the cerebellum of rat. **Experientia**, v.17, p. 572-573, 1961.
- FRAGA, J.A.A.; VARELA, D.S.S. A relação entre a desnutrição e o desenvolvimento infantil. **Revista Associação Brasileira de Nutrição**, v. 4, N.5, 2012.
- FRANCISCO, E.S.; GUEDES, R.C.A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, v. 47, p. 2437-2445, 2015.
- FRAZÃO, M.F; MAIA, L.M.S.S; GUEDES, R.C.A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v.4, n.47, p.26-30, 2008.
- 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 of Neuroscience Research**, v.74, p. 806-817, 2003.
- FOOTITT, D.R.; NEWBERRY, N.R. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. **Brain Research**, p. 339-342, 1998.
- GERMANO, P.C.S.; SILVA, D.L.; SOARES, G.S.F.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 275-281, 2013.
- GOADSBY, P.J. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and Therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, p. 39–44, 2006.
- GOMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; ROY, R.R.; MOLTENI, R.; EDGERTON, V.R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity, **Journal of Neurophysiology**, v. 88, p. 2187-2195, 2002.

- GORJI, A.; SPECKMANN, E. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. **European Journal of Neuroscience**, v.19, p. 3371-3374, 2004.
- GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, v. 38, n. 1, p.33–60, 2001.
- GUEDES, R.C.A.; ROCHA-DE-MELO, A.; LIMA, K.R.; ALBUQUERQUE J.M.S.; FRANCISCO, E.S. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 142-146, 2013.
- GUEDES, R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy; Ronald R Watson; Colin R Martin. (Org.). **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. 1 ed. London: Springer, v. 1, p. 2343-2355, 2011.
- GUEDES, R.C.A.; VASCONCELOS, C.A.C. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neuroscience Letters**, v. 442, p. 118-122, 2008.
- GUEDES, R.C.A. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: Liebermann, H., Kanarek, R. and Prasad, C. (Eds.), "Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field", CRC Press, New York. **Nutrition, Brain and Behavior Series**, v.3, chapter 4, p. 39-54, 2005.
- GUEDES, R.C.A.; TSURUDOME, K.; MATSUMOTO, N. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v.1036, p. 109-114, 2005.
- GUEDES, R.C.A.; ROCHA-DE-MELO A.P; TEODÓSIO, N.R. Nutrição adequada a base para o funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, v.56, p. 32-35, 2004.
- GUEDES, R.C.A.; CAVALHEIRO, E.A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Research**, v. 27, p. 33–40, 1997.
- GUEDES, R.C.A.; MONTEIRO, J.S.; TEODÓSIO, N.R., Malnutrition and brain function: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, n.1, p. 293-301, 1996.
- 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.; FRADE, S.F. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 1123-1128, 1993.
- GUEDES, R.C.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M.S. Effect of pre and postnatal propylthiouracil administration on propagation cortical spreading depression of adult rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 1123-1128, 1993.
- GUEDES, R.C.A.; CABRAL-FILHO, J.E.; TEODOSIO, N.R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. In: Do CARMO, R.J. (Ed.), Spreading Depression, **Experimental Brain Research Series**. Springer, Berlin, p. 17– 26, 1992.
- GUEDES, R.C.A.; BARRETO, JM. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 4, p. 393-397, 1992.
- GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M.C.; SILVA, A.T.; TEODÓSIO, N.R. Effect of dietary Lithium on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 923-925, 1989.
- 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**, v.20, p. 639-642, 1987.
- GUEDES, R.C.A.; DO CARMO, R.J. Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental Brain Research**, v. 39, p. 341-349, 1980.
- GUENDLER, J.A.; BARROS, K.M.F.T.; ALVES, R.M.R.; MELO-JÚNIOR, M.R.; FRANÇA, T.J.B.M.; FILHO, J.L.S.A.; PONTES-FILHO, N.T. Efeitos da natação precoce sobre o córtex motor de ratos desnutridos. **Neurobiologia**, v. 71, n. 3, p. 75-85, 2008.
- HILLMAN, C.H.; BELOPOLSKY, A.V.; SNOOK, E.M.; KRAMER, A.F.; MCAULEY, E. Physical activity and executive control: implications for increased cognitive health during older adulthood. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, v. 75, p. 176-185, 2004.
- 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**, v. 1, n. 80, p. 115-127, 2008.
- KANDEL, E.R.; SQUIRE, L.R. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. **Science**, v. 290, p. 1113-1120, 2000.
- KIM, K.; CHUNG, E.; KIM, C.J.; LEE, S. Swimming exercise during pregnancy alleviates pregnancy-associated long-term memory impairment. **Physiology & Behavior**, v.107, n. 1, p. 82-86, 2012.
- KO, I.G.; KIM, S.E.; KIM, T.W.; JI, E.S.; SHIN, M.S.; KIM, C.J.; HONG, M.H.; BAHN, G.H. Swimming exercise alleviates the symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder in spontaneous hypertensive rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, p. 393-400, 2013.
- KURTH,T.; CHABRIAT, H.; BOUSSER, M.-G. Migraine and stroke: a complex association with clinical implications. **Lancet Neurology**, v. 11, p. 92-100, 2012.
- LATIMER, C.S.; SEARCY, J.L.; BRIDGES, M.T.; BREWER, L.D.; POPOVIC, J.; BLALOCK, E.M.; LANDFIELD, P.W.; THIBAUT, O.; PORTER, N.M. Reversal of Glial and Neurovascular Markers of Unhealthy Brain Aging by Exercise in Middle-Aged Female Mice. **PLoS ONE**, v. 6 (10), p. 1-8, 2011.
- LAURITZEN, M.; DREIER, J.P.; FABRICIUS, M.; HARTINGS, J.A.; GRAF, R.; STRONG, A.J. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 31, p. 17–35, 2011.
- LEÃO, A.A.P. The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. **Journal of Neurophysiology**, v. 3, p. 315-321, 1951.
- LEÃO, A.A.P. & MARTINS-FERREIRA, H. Nota sobre a ocorrência da depressão alastrante no hipocampo e no corpo estriado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 30, n. I, 1958.
- LEÃO, A.A.P. & MARTINS-FERREIRA, H. Nota acerca da depressão alastrante no cerebelo, tubérculo quadrigêmeo anterior e bulbo olfativo. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 33, p. XXXIX-XL, 1961.
- LEÃO, A.A.P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex, **Journal of Neurophysiology**, v.10, p. 409–414, 1947.
- LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, p. 359-390, 1944a.

- LEÃO, A.A.P. Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, v. 7, p. 391-396, 1944b.
- LECKIE, R.L.; OBERLIN, L.E.; VOSS, M.W.; PRAKASH, R.S.; SZABO-REED, A.; CHADDOCK-HEYMAN, L.; PHILLIPS, S.M.; GOTHE, N. P.; MAILEY, E.; VIEIRA-POTTER, V.J.; MARTIN, S.A.; PENCE, B.D.; LIN, M.; PARASURAMAN, R.; GREENWOOD, P.M.; FRYXELL, K.J.; WOODS, J.A.; McAULEY, E.; KRAMER, A.F.; ERICKSON, K.I. BDNF mediates improvements in executive function following a 1-year exercise intervention. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 1-12, 2014.
- LEE, H – H; HONG, K.; JIN-WOO, L.; HYE-YOUNG, Y.; HYUN-KYUNG, C.; TAECK-HYUN, L.; MIN-CHUL, S.; MYOUNG-HWA, L.; MAL-SOON, S.; SOOYEON, P.; SEUNGSOO, B.; CHANG-JU, K. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain & Development**, v. 28, p. 147-154, 2006.
- LENOIR-WIJNKOOP, I.; DAPOIGNY, M.; DUBOIS, D.; VAN GANSE, E.; GUTIE ´RREZ-IBARLUZEA, I.; HUTTON, J.; JONES, P.; MITTENDORF, T.; POLEY, M. J.; SALMINEN, S.; NUIJTEN, M. J. C. Nutrition economics – characterizing the economic and health impact of nutrition. *British Journal of Nutrition*, v. 105, p. 157–166, 2011.
- LIMA, C.B.; SOARES, G.S.F.; MARCELE-VITOR, S.; CASTELLANO, B.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression features and Iba 1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 98-105, 2014.
- LIMA, C.B.; SOARES, G.S.F.; VITOR, S.M.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; CASTELLANO, B.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 98-105, 2013.
- LIMA, E.S. Quantidade, qualidade, harmonia e adequação: princípios-guia da sociedade sem fome em Josué de Castro. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.171-194, 2009.
- 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**, v. 85, p. 241-247, 2009.
- LYNCH, G.; REX, C.S.; GALL, C.M. LTP consolidation: substrates, explanatory power and functional significance. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 12-23, 2007.
- LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; DOS-SANTOS, E.M.; GUEDES, R.C.A. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Research**, v. 1591, p. 93-101, 2014.
- MAIA, L.M.S.S.; AMANCIO-DOS-SANTOS A.; DUDA-DE-OLIVEIRA D.; ANGELIM M.K.C.; GERMANO P.C.P.; SANTOS S.F.; GUEDES R.C.A. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. **Nutritional Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73-80, 2009.
- MAIA, L.M.S.S.; FRAZAO, M.F.; SILVA, M.B.; SOUZA, T.K.M.; ROCHA DE MELO, A.P.; SANTOS, A.A.; PICANÇO DINIZ, C.W.; GUEDES, R.C.A. L- arginine

- treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v. 1072, p. 19-25, 2006.
- MAIA, L.M.S.S.; SANTOS, A.A. Alimentos e suas ações em sistemas fisiológicos **Veredas FAVIP**, Caruaru, v. 3, n. 1 e 2, p. 24-34, 2006.
- MALENKA, R.C. The long-term potential of LTP. **Nature Reviews**, v. 4, p. 923-926, 2003.
- MALENKA, R.C.; BEAR, M.F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, p. 5-21, 2004.
- MAYEVSKY, A.; DORON, A.; MANOR, T. *et al.* Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. **Brain Research**, v. 740, p. 268-274, 1996.
- MENDES-DA-SILVA, R.F.; LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; BANDIN-DA-SILVA, M.E.; CAVALCANTI, G.A.; RODRIGUES, A.R.O.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; GUEDES, R.C.A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 155-160, 2014.
- MONTE, C.M.G., Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 285-297, 2000.
- MONTE-GUEDES, C.K.R.; ALVES, E.V.S.; VIANA-DA-SILVA, E.; GUEDES, R.C.A. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, p. 191-194, 2011.
- MONTEIRO, C.A. Fome, desnutrição e pobreza: além da semântica. **Saúde e Sociedade**, v.1 (12), p. 7-11, 2003.
- MONTEIRO, C.A.; CONDE, W.L.; POPKIN, B.M. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. **American Journal of Public Health**, v.94, p.433-4, 2004.
- MONTEIRO, C.A.; BENICIO, M.H.D.; KONNO, S.C.; SILVA, A.C.F.; LIMA, A.L.L.; CONDE, W.L. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996-2007. **Revista Saúde Pública**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2009.
- MONTEIRO, H.M.C.; BARRETO-SILVA, N.L.; SANTOS, G.E.; SANTOS, A.S.; SOUSA, M.S.B.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. Physical exercise versus fluoxetine: Antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 49-54, 2015.
- MONTEIRO, H.M.C.; SILVA, D.L.; FRANÇA, J.P.B.D.; MAIA, L.M.S.S.; ANGELIM, M.K.C.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Differential effects of physical exercise and L-Arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, p. 112-118, 2011.
- MORA, F.; SEGOVIA, G.; DEL ARCO, A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain Research Review**, v.55, p. 78-88, 2007.
- MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v. 26, p. 471-483, 2002.
- MORGANE, P.J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p 92-128, 1993.
- MORGANE, P.J.; MILLER, M; KEMPER, T.; STER, W.; 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**, v. 2, p. 137-230, 1978.

- MOSKOWITZ, M.A. Pathophysiology of headache – past and present. **Headache**, v. 47, Suppl 1, p. 58–63, 2007.
- NEEPER, S.A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, p. 373-109, 1995.
- NICOLL, R.A.; ROCHE, K.W. Long-term potentiation: peeling the onion. **Neuropharmacology**, v.74, p. 18-22, 2013.
- O'CALLAGHAN, R.M.; OHLE, R.; KELLY, A.M. The effect of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. **Behavioral Brain Research**, v. 176, p. 362-366, 2007.
- PHILIPPI et. al., IN CUPPARI, L., **Nutrição: Nutrição clínica no adulto**. São Paulo: Manole, 2003.
- PIMENTEL, J.; TOJAL, R.; MORGADO, J. Epilepsy and physical exercise. **Seizure**, v. 25, p. 87-94, 2015.
- PORTO, J.A.; OLIVEIRA, A.G.; LAGURA, A.; ADAM, T.S.; NUNES, M.L. Efeitos da epilepsia e da desnutrição no sistema nervoso central em desenvolvimento: aspectos clínicos e evidências experimentais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 16, n. 1, p. 26-31, 2010.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C. LAMANTIA, A-S; McNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. **Neurociências**. 2 °ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- PUSIC, D.A.; MITCHELL, H.M.; KUNKLER, P.E.; KLAUER, N.; KRAIG, R.P. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental Neurology**, v. 264, p. 43-54, 2015.
- RANADE, S.C.; SARFARAZ NAWAZ, M.; KUMAR RAMBTLA, P.; ROSE, A.J.; GRESSENS, P.; MANI, S. Early protein malnutrition disrupts cerebellar development and impairs motor coordination. **British Journal of Nutrition**, v.107, n. 8, p. 1167-1175, 2012.
- REAL, C.C.; GARCIA, P.C.; BRITTO, L.R.G.; PIRES, R.S. Different protocols of treadmill exercise induce distinct neuroplastic effects in rat brain motor areas. **Brain Research**, v. 1624, p. 188-198, 2015.
- ROCHA-DE-MELO, A.P.; CAVALCANTI, J.B.; BARROS, A.S.; GUEDES, R.C.A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, n. 3/4, p. 155-160, 2006.
- ROCHA-DE-MELO, A.P.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; BORBA, J.M.C.; SANTOS-MONTEIRO, J; GUEDES, R.C.A. NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropile and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation in different litter sizes. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 207-216, 2004.
- ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previous submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663-669, 1997.
- ROSE, S.P.R. Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term memory formation. **Trends Neuroscience**, v. 18, p. 502-506, 1995.
- ROTMAN, S.M.; MATTSON, M.P. Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. **Neuroscience**, v. 239, p. 228-240, 2013.
- SANTOS, R.S. Nutrição, hipertireoidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados. Tese (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

- SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N.R.; GUEDES, R.C.A. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 3, p.29–40, 2000.
- SCRIMSHAW, N.S.; GORDON, J.E. Malnutrition, learning and behavior. **MIT. Press**, Cambridge/MA, 1968.
- SMITH, A.D.; ZIGMOND, M.J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Experimental Neurology**, v. 184, p. 31-39, 2003.
- SOARES, G.S.F.; LIMA, C.B.; CAVALCANTI, L.C.; VILLACAMPA, N.; CASTELLANO, B.; GUEDES, R.C.A. Brain effects of the lectin from *Canavalia ensiformis* in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: A spreading depression and microglia immunolabeling study. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 307-315, 2015.
- SOMJEN, G.G. Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization. **Physiological reviews**, v. 81, n. 3, p. 1065-1096, 2001.
- SOMJEN, G.G.; AITKEN, P.G.; CZECH, G.L.; HERRERA, O.; JING, J.I.; YOUNG, J.N. Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, p. 248-254, 1992.
- SOSNOFF, J.J.; BALANTRAPU, S.; PILUTTI, L.A.; SANDROFF, B.M.; MORRISON, S.; MOTL, R.W. Cognitive processing speed is related to fall frequency in older adults with Multiple Sclerosis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 94, p. 1567-72, 2013.
- SOUZA, T.K.M.; SILVA-GONDIM, M.B.; RODRIGUES, M.C.A.; GUEDES, R.C.A. Anesthetic agents modulate ECoG potentiation after spreading depression, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect, *Neuroscience Letters*, v. 592, p. 6-11, 2015.
- SOUZA, T.K.M.; SILVA, M.B.; GOMES, A.R.; OLIVEIRA, H.M.; MORAES, R.B.; FREITAS BARBOSA, C.T.; GUEDES, R.C.A. Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats. **Experimental Brain Research**, v. 214, p. 463-469, 2011.
- SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; RAMBO, L.M.; RIBEIRO, L.R.; LIMA, F.D.; CORTE, L.C.D.; SILVA, L.F.A.; RETAMOSO, L.T.; CORTE, C.L.D.; PUNTEL, G.O.; AVILA, D.S.; SOARES, F.A.A.; FIGHERA, M.R.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.F. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, p. 811–823, 2009.
- STEELE, R.M.; BRAGE S.; CORDER K.; WAREHAM N.J.; EKELUND U. Physical activity, cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome in youth. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, p.342–351, 2008.
- STREIT, D.S.; FERREIRA-FILHO, C.R.; MARTINS-FERREIRA, H. Spreading Depression in Isolated Spinal Cord. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, p. 887-890, 1995.
- TENORIO, A.S.; OLIVEIRA, I.D.V.A.; GUEDES, R.C.A. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 431-437, 2009.
- TEYLER, T.J.; DISCENNA, P. Long-Term Potentiation as a Candidate Mnemonic Device. **Brain Research Reviews**, v. 7, p. 15-28, 1984.
- 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**, v. 3, n. 10, p. 141-151, 1988.

- TORRENTE, T.; CABEZAS, R.; AVILA, M.F.; GARCÍA-SEGURA, L.M.; BARRETO, G.E.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 2-6, 2014a.
- TORRENTE, D.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; LOPES, A.A.C.; GONZÁLEZ, J.; BARRETO, G.E.; GUEDES, R. C.A. Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 87-90, 2014b.
- TRINDADE-FILHO, E.M.; VASCONCELOS, C.A.; GUEDES, R.C.A. Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in RE sleep deprived and nondeprived adult rats. **Psychology Neuroscience**, v. 2, p. 235-241, 2009.
- VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. **J. Neurosci. Res**, v. 76, p. 356-362, 2004.
- VAN PRAAG, H.; SHUBERT, T.; ZHAO, C.; GAGE, F.H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 8680-8685, 2005.
- VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., CAGE, F. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, p. 191-198, 2000.
- VASCONCELOS, C.A.; DE OLIVEIRA, J.A.F.; DE OLIVEIRA COSTA L.A.; GUEDES, R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 163-170, 2004.
- VEDOVELLI K.; SILVEIRA, E.; VELHO, E.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; SCHORODER, N.; BROMBERG, E. Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 284-291, 2011.
- VERÍSSIMO, M.T.; ARAGÃO, A.; SOUZA, A.; BARBOSA, B.; RIBEIRO, H.; COSTA, D.; SALDANHA, M. H. Effect of physical exercise on lipid metabolism in the elderly. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 21, n. 10, p.1099-1112, 2002.
- WABER, D.P.; BRYCE, C.P.; GIRARD, J.M.; ZICHLIN, M.; FITZMAURICE, G.M.; GALLER, J.R. Impaired IQ and academic skills in adults who experienced moderate to severe infantile malnutrition: A 40-year study. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 58-64, 2014.
- WARTELOW, J.C. Protein-energy malnutrition: the nature and extent of the problem. **Clinical Nutrition**, v. 16, p. 3-9, 1997.
- WEI, Y.; ULLAH, G.; SCHIFF, S.J. Unification of neuronal spikes, seizures, and spreading depression. **Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 11733-11743, 2014.
- WHO/FAO EXPERT CONSULTATION. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/ FAO Expert Consultation, **WHO Technical Report Series** v. 916, p. 1-149, 2003.
- 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 Medical and Biological Research**, v. 24, p. 1277-1281, 1991.
- ZHONG, T., REN, F., HUANG, C.S., ZOU, W.Y., YANG, Y., PAN, Y.D., SUN, B., WANG, E., GUO, Q.L. Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice. **Neuroscience**, v. 316, p. 378-388, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Protocolo do Animal

Identificação

Animal / Linhagem	Rato / Wistar
Data de Nascimento	
Marca/Gaiola	
Condição Experimental	
Dieta	Presença Ratos e Camundongos com 23% de proteína

Evolução Ponderal

Data	Idade (dias)	Peso	Data	Idade (dias)	Peso
	7			30	
	14			60	
	21			75	
	23			90	

Teste de Reconhecimento de Novo Objeto

Ansiedade

Adaptação	Centro	Periferia
Tempo 1 (min)		
Tempo 2 (min)		
Tempo 3 (min)		

Memória

Teste 1	Objeto A	Objeto B
Tempo (min)		
Teste 2	Objeto A ou B	Objeto C
Tempo (min)		
Teste 3	Objeto A ou B	Objeto C
Tempo (min)		

Registro da Depressão Alastrante Cortical

Data do Experimento	
Peso do Animal no dia do Registro	
Idade do Rato (em dias)	
Anestésico (10ml/ml)	1 g/Kg de uretana + 40 mg/Kg de cloralose
Dose / hora do anestésico	
Distância entre os eletrodos (D1 e D2)	
Canal 1: 2: 3: 5:	
Observações quanto à cirurgia	
Início: Estímulo:	
Fim:	
Perfusão	U+C: Heparina: Salina: PFA 4%:

Registro das amplitudes do ECoG

D1

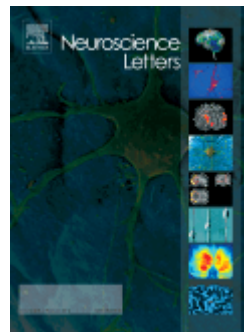
D2

		a (30min)	b (30min)	a (30min)	b (30min)
Antes da DAC (Período controle)	1ª hora				
	2ª hora				
Depois da DAC (Período teste)	3ª hora				
	4ª hora				

APÊNDICE B – Artigo 1

TITLE:

Early swimming exercise differentially modulates electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats previously suckled in different litter sizes



AUTHORS: Mariana Barros e Silva-Gondim^a, Thays Kallyne Marinho de Souza^a, Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues^b, Rubem Carlos Araújo Guedes^{a*}

AFFILIATION: ^a Laboratory of Nutrition Physiology, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-600 Recife, PE, Brazil

* = **Corresponding Author:** Rubem C. A. Guedes, MD, PhD

Av. Prof. Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 |

Phone: +55 81 2126-8936

Email: guedes.rca@gmail.com

or

rguedes@ufpe.br

Abstract

Swimming exercise and nutritional deficiency in early life can affect the electrophysiological organization of the brain during development. The interaction of both factors still remains a matter of investigation. In this study, we analyzed the effect of this interaction on the electrocorticogram potentiation that occurs after the excitability-related phenomenon that is known as cortical spreading depression (CSD). Male rats were suckled in litters with six or 12 pups (L_6 and L_{12} groups). The average body and brain weights for the L_{12} groups were lower than those of the L_6 groups ($p < 0.05$), thereby confirming the nutritional deficiency. From postnatal days (P) 8-23, the rats were subjected to swimming exercise or remained sedentary. Between P90 and P120, ECoG was recorded on two points of the cortical surface for 2 h. After this "baseline" recording, CSD was then elicited every 30 min over the course of 2 h (CSD recording period). In comparison to baseline values, ECoG amplitudes after CSD increased 14%-43% for all experimental conditions ($p < 0.05$). In the L_6 condition, but not the L_{12} condition, swimming reduced the post-CSD ECoG potentiation in comparison to the L_6 sedentary group ($p < 0.05$). In four additional groups (two L_6 and two L_{12} – of which one exercised and one sedentary), ECoG was performed during 4 h without CSD elicitation, and no ECoG potentiation was observed. Our data confirm the CSD-associated ECoG potentiation and indicate that swimming exercise early in life attenuates this effect in the L_6 condition but not in the L_{12} condition, thereby suggesting an interaction between swimming exercise and the nutritional status during the lactation.

Keywords: Swimming exercise; Nutritional deficiency; Brain development; Electroencephalogram; Cortical spreading depression; Rat.

Introduction

Several pieces of evidence suggest that swimming exercise is associated with beneficial effects on brain development and functioning. However, these effects have been documented more thoroughly in the adult brain than in developing organisms [1]. These studies include brain excitability-related electrophysiological effects [2]. Furthermore, the interaction of swimming exercise with other factors, such as nutritional deficiency early in life, remains to be investigated.

Proper nutrition with a balanced intake of all nutrients, and the practice of exercising throughout life promote health and can help in preventing or controlling various specific neural disturbances, including mental illnesses. A nutritional insult early in life may interfere with the brain developmental process, including electrophysiological parameters [3]. Physiological parameters, such as those involved in consciousness, cognition, learning, memory, and emotion, can be impaired by early malnutrition [4]. The developing organism may become more susceptible to certain neurological disturbances, such as epilepsy, as a consequence of nutritional deficiency [4, 5].

In this study, we analyzed the effect of the interaction between swimming exercise and nutritional deficiency early in life on the potentiation of the amplitude of electrocorticogram that occurs after eliciting the excitability-related phenomenon that is known as cortical spreading depression (CSD) [6–8]. CSD consists of a transient suppression of cortical electrical activity that propagates concentrically in response to chemical, electrical or mechanical stimulation of the cortical tissue [9, 10]. It is now well-established that early-malnourished adult rats are more susceptible to CSD than are well-nourished controls [3, 11]. A negative nutritional impact early in life can be easily produced in the rat by increasing litter size during the lactation period [4, 11].

During CSD, normal electroencephalographic activity may give rise to abnormal, high-amplitude "epileptiform waves" [9], which indicate a CSD-linked increase in neuronal excitability, most likely via synaptic activity enhancement, as evidenced by an increased ECoG amplitude. This ECoG potentiation was initially described *in vitro* [12]. More recently, we demonstrated this ECoG potentiation following CSD in the rat cortex [6, 7].

For these reasons, this study addressed the two following questions: (1) would early swimming influence the post-CSD ECoG potentiation effect? (2) Could nutritional deficiency during the lactation period (suckling in large litters) interact with exercise and modulate its effect?

Materials and Methods

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of our university (approval protocol number 23076.017295/2012-17), which complies with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Lactation conditions

As previously described [11], we induced nutritional deficiency in male Wistar rat pups during the lactation period by increasing the number of pups to be suckled by one dam (12 pups per litter) in comparison to the control litter size (6 pups). These two, nutritionally distinct groups were denominated, respectively, as the L₁₂ and L₆ groups (n= 28 in each group).

Animals were maintained throughout the experiment in polypropylene cages (51 cm x 35.5 cm x 18.5 cm) in rooms at a temperature of 22 ± 1 °C and in a light/dark cycle of 12/12 h

(light phase beginning at 6:00 a.m.) with free access to water and food (commercial laboratory chow diet with 23% protein; Purina do Brasil Ltda).

Body weights were measured at postnatal days 7, 21, 30, 60 and 90, and brain weights were obtained at the end of electrophysiological recording.

Swimming exercise

Sixteen L₆ and 13 L₁₂ rats were randomly chosen and subjected to exercise (swimming), as described below. The remaining twelve L₆ and fifteen L₁₂ animals constituted the sedentary controls, thereby forming the four groups of this study.

Swimming in early life was performed from postnatal days 8 to 23 according to the protocol of Guendler and co-workers [13]. Briefly, the pups were submitted to swimming in a plastic box measuring 33x40x17 cm without additional resistance on paws or tail and always between 8:00 and 12:00 am. The water was preheated and maintained at a temperature of $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The water level was adjusted so as not to allow the animal's paws to touch the bottom of the swimming box. An initial adaptation of the animals to the aquatic environment was performed on the postnatal (P) days 8, 9 and 10 when the animal remained in the water tank for 2 min, 5 min and 10 min, respectively. The animals rested on days P11 and P12. Next, from days P13 to P17, the animals progressively swam for 15, 20, 25, 30 and 40 minutes / day. The animals rested on days P18 and P19 and swam 40 minutes/day from days P20 to P23. After each swimming session, the animals were dried, warmed and returned to their mother.

The sedentary control animals were placed in the same tank according to the same protocol, but the water level was kept low such that the animals underwent the same type of water stress without having to swim.

Electrophysiological recording

When the animals were 90–120 days of age, they were intraperitoneally anesthetized with a mixture of 1000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (Sigma; 10 ml/kg). Three holes were drilled at the level of the right cerebral hemisphere, lined up in the frontal-to-occipital direction and parallel to the midline. The first orifice (2 mm diameter) that was drilled at the frontal bone was used for stimulation with 2% potassium chloride solution, which is the amount necessary to elicit CSD. The two other holes (2-3 mm diameter) were drilled on the parietal bone. These holes served as recording places and were designated, respectively, as the **n** (near) and **r** (remote) recording points in relation to the CSD elicitation point.

CSD was recorded with a pair of Ag–AgCl agar-Ringer electrodes prepared in the laboratory, as previously described [14]. A third electrode of the same type was placed on the nasal bone and was used as a common reference electrode. The slow potential change accompanying CSD and the ECoG were continuously recorded on the cortical surface for 4 hours through a digital recording system (Biopac MP 100, USA).

The two initial recording hours constituted the baseline period, during which no KCl stimulus was applied and, consequently, no CSD was elicited. In the last two recording hours, four CSD episodes were elicited at 30-min intervals by 1 min of cortical stimulation with 2% KCl (CSD period). As the basis for assessing the occurrence of potentiation of spontaneous electrical activity, in each animal, we compared the amplitudes of the ECoG before and after eliciting CSD. For each recording amplifier, the gain was kept constant throughout the record. During the recording period, the animal was maintained on an electric heater such that the rectal temperature remained stable ($37 \pm 1^\circ \text{C}$) and could be adjusted when necessary. In four additional groups (two L_6 and two L_{12} – of which one exercised and one sedentary), ECoG was performed for 4 h without CSD elicitation.

After terminating the ECoG recording session, the still-anesthetized animal was subjected to euthanasia (by lesioning the bulbar region), and the brain was immediately removed and weighed.

Quantitative analysis of cortical electrical signals

ECoG samples of approximately 10 min were analyzed at four time points of the electrophysiological record: two in the initial recording period and two in the final period. These samples were analyzed off-line with the aid of an algorithm that was implemented in the software MATLABTM, version R2011b, which calculates their average amplitudes.

From these values, we proceeded to the data normalization stage, with a unitary value assigned to the lowest amplitude. For each animal, the ECoG amplitudes values were normalized, expressed in relative units and compared in the same animal, before and after the presence of CSD, as a basis for analyzing the occurrence of spontaneous electrical activity potentiation. Significant amplitude increases in the final period were considered evidence of CSD-linked ECoG potentiation [6, 7].

Statistical analysis

Intra-group amplitude differences in the spontaneous cortical activity (amplitudes before versus after CSD) were analyzed using Student's paired t-test. The inter-group differences (ECoG amplitudes, body weights, and brain weights) were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA), including lactation condition (L₆ and L₁₂) and exercise (i.e., swimming and sedentary) as factors. This was followed by a post hoc (Holm–Sidak) test, where indicated. Differences were accepted as significant when $p < 0.05$.

Results

Lactation conditions as well as body- and brain-weight changes

Body- and brain-weights were lower in the L₁₂ groups in comparison with the L₆ groups, with body weights being significantly different ($p < 0.05$) from 7 to 90 postnatal days. The average body weight reduction was $19.0 \pm 4.3\%$ for exercised and $19.5 \pm 6.1\%$ for sedentary rats. The average brain weight reduction was $16.7 \pm 1.7\%$ for exercised rats and $18.6 \pm 2.7\%$ for sedentary rats.

Exercise had no effect on body and brain weight, neither in the L₆, nor in the L₁₂, condition. Data on body and brain weights are summarized in Figure 1.

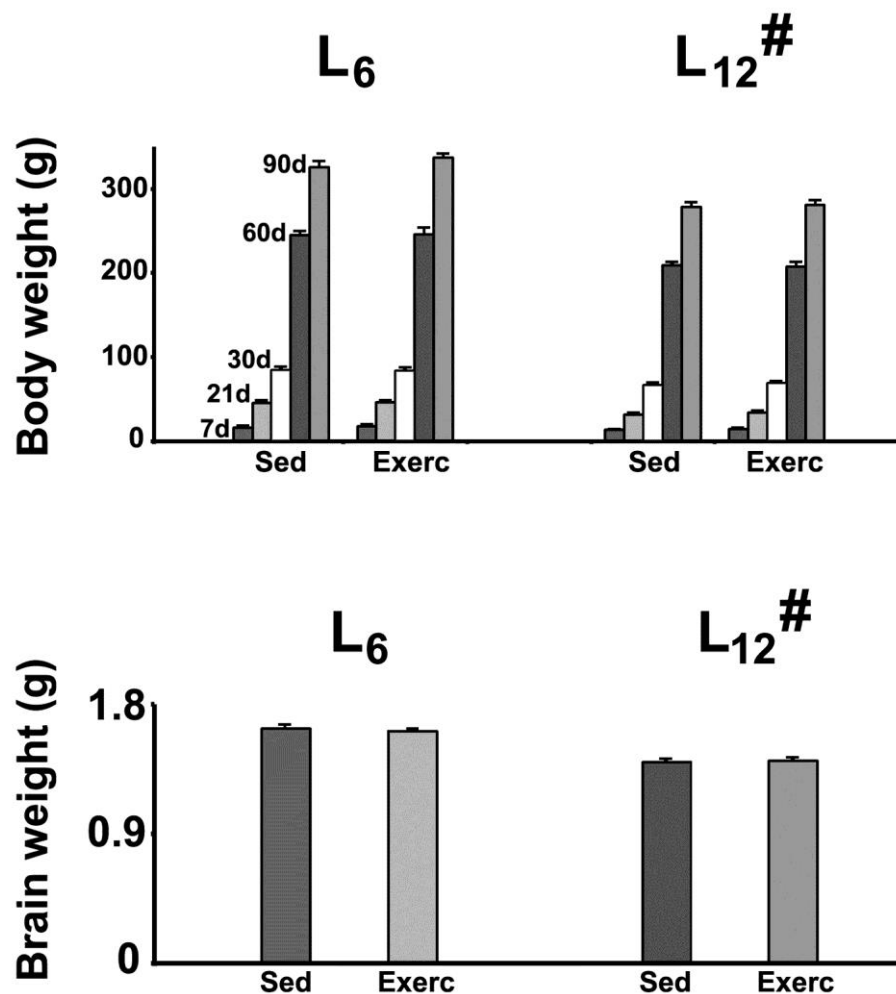


Figure 1. Body and Brain weights of exercised (Exerc) and sedentary (Sed) rats suckled in litters with 6 or 12 pups, (lactation conditions respectively denominated L₆, and L₁₂). Body weights were measured on days 7, 21, 30, 60 and 90. Brain weights are from rats at 90-120 days of age. Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean. Data are from 16 and 13 exercised and 12 and 15 sedentary animals, for the L₆ and L₁₂ groups, respectively. The symbol # indicate that L₁₂ values are significantly lower than those of the corresponding L₆ groups ($p < 0.05$; two way ANOVA, followed by Holm-Sidak test).

CSD potentiates the ECoG amplitude

In all experimental groups, the ECoG amplitudes in the final period of the recording session was significantly higher ($p < 0.05$) than those of the baseline values (Initial period) for both recording points (**n** and **r**). Under the L₆ condition, the percent increase in the ECoG amplitude was 43.11% (sedentary) and 18.28% (exercised) for the recording point **n** and 38.05% (sedentary) and 14.65% (exercised) for the point **r**. Under the L₁₂ condition, the percent ECoG increase was 32.17% (sedentary) and 38.4% (exercised) for the recording point **n**, and 32.16% (sedentary) and 27.58% (exercised) for the point **r**. Representative ECoG recordings and quantitative data documenting the ECoG potentiation after CSD are in the upper panels of Figures 2 and 3.

In order to exclude the possibility that the ECoG activity was potentiated by the duration of the ECoG recording, we recorded the ECoG for 4 h without eliciting CSD (no KCl stimulus was applied) in 19 L₆ rats (nine sedentary and 10 exercised) and 16 L₁₂ animals (nine sedentary and 7 exercised). In these animals, under no-CSD condition, no amplitude increase was observed (lower panels of Figures 2 and 3).

The comparison between sedentary and exercised groups suggested an interaction between lactation condition and exercise in both recording points (**n** and **r**) for the L₆, but not for the L₁₂, groups. L₆ exercised animals displayed an ECoG potentiation of a lower magnitude ($p < 0.05$) than did the L₆ sedentary rats (upper panel of Figure 2).

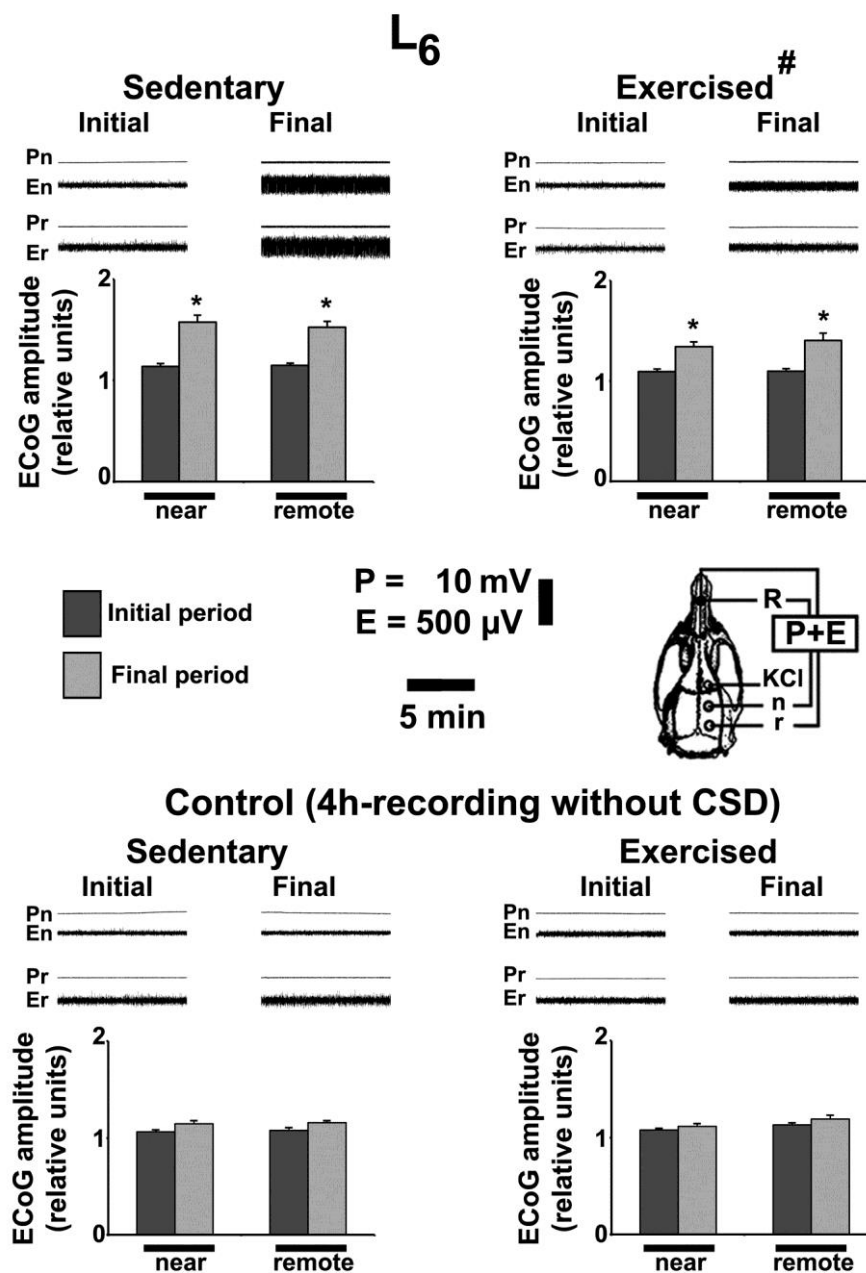


Figure 2. Examples of spontaneous cortical activity (electrocorticogram - E) and DC-potential (P) recordings in the right hemispheres of four rats at 90–120 days of age from the L₆ group. The traces in

the upper and lower panels are from rats that did receive KCl stimulation (CSD group) and did not receive KCl (control group, without CSD), respectively. Traces in the final period were taken at the following temporal intervals (t) after beginning CSD elicitation: L₆ sedentary, t=95 min (after the 4th CSD episode had been elicited); L₆ exercised, t=75 min (after the 3th CSD episode). The bar graphs represent the ECoG amplitude (the mean $\pm$ standard error of the mean) in relative units (the lowest value was considered equal to 1) for 12 sedentary and 16 exercised rats of the CSD group, and 9 sedentary and 10 exercised animals that were not exposed to CSD. The diagram of the skull indicates the positions of the common reference electrode (**R**), the place of **KCl** application to elicit CSD, and the near (**n**) and remote (**r**) recording locations (in relation to the stimulating point). $\ast=p<0.05$ compared with the initial period (paired t-test). The symbol # indicates that the potentiation percentage of the exercised group was lower than in the sedentary group ($p<0.05$; two-way ANOVA followed by Holm-Sidak test). In the CSD-free groups, there were no statistically significant differences between the values of the initial and final periods.

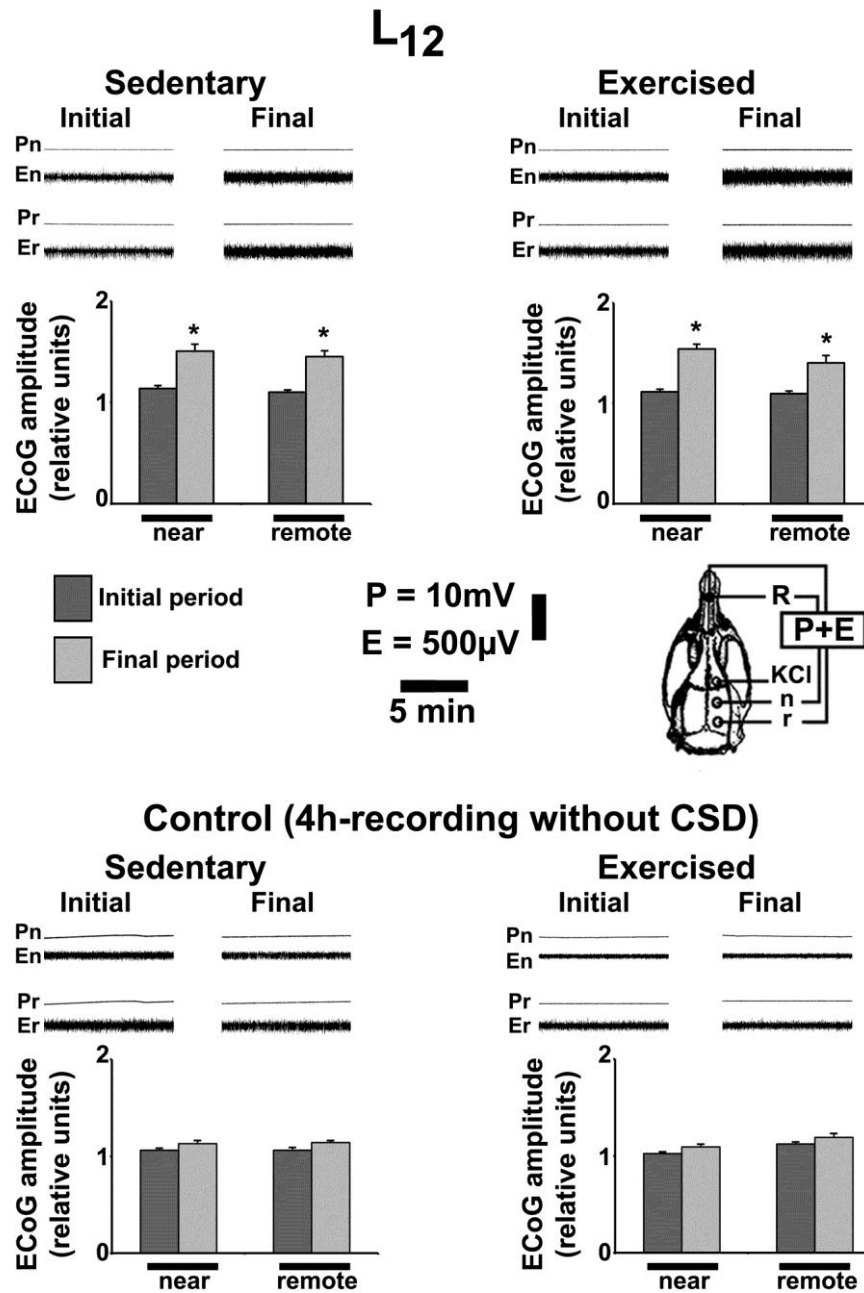


Figure 3. Examples of spontaneous cortical activity (Electrocorticogram - E) and DC-potential (P) recordings in the right hemispheres of four rats at 90–120 days of age from the L₁₂ group. The traces in the upper and lower panels are from rats that did receive KCl stimulation (CSD group) and did not receive KCl (control group, without CSD), respectively. Traces in the final period were taken at the following temporal intervals (t) after beginning CSD elicitation: L₁₂ sedentary, t=50 min (after the 2nd CSD episode had been elicited); L₁₂ exercised, t=45 min (after the 2nd CSD episode). The bar graphs represent the ECoG amplitude (the mean $\pm$ standard error of the mean) in relative units (the lowest

value was considered equal to 1) for 15 sedentary and 13 exercised rats of the CSD group, and nine sedentary and seven exercised animals that were not exposed to CSD. The diagram of the skull indicates the positions of the common reference electrode (**R**), the place of **KCl** application to elicit CSD, and the near (**n**) and remote (**r**) recording locations (in relation to the stimulating point). *= higher ECoG amplitudes compared with the initial period ($p < 0.05$; paired t-test). In the control groups, without CSD, no amplitude increase was observed between the values of the initial and final periods.

Discussion

In this *in vivo* study, we confirmed the potentiation of the ECoG amplitudes after CSD in the rat cerebral cortex. We also demonstrated, for the first time, that swimming exercise early in life (P 8–23) clearly reduced ECoG potentiation and a nutritional deficiency during this period counteracted that effect. Because the ECoG potentiation was measured when the animals were adults (P90–120), we suggest that the effect of swimming exercise on CSD-related ECoG potentiation is long-lasting and might be permanent, as suggested previously regarding the effects of exercise on other brain morphological and electrophysiological parameters [14].

Exercise can affect brain excitability; Tutkun and colleagues [15] demonstrated that swimming exercise reduced penicillin induced epileptiform ECoG activity in rats, reinforcing the important influence of exercise on neuronal excitability. In line with this evidence, in the present work, exercised rats under the L₆ condition presented a significantly lower CSD-induced ECoG potentiation than did rats under the L₆ sedentary condition. In support of the effect of exercise modulation, previous reports from others have demonstrated that treadmill exercise [14] and environmental stimulation, including swimming exercise [16], decrease neocortical susceptibility to CSD and attenuate brain deleterious effects of malnutrition in rats [16].

We failed to observe ECoG potentiation in our CSD-free groups, in which no CSD was elicited during the 4-h recording period. This finding clearly indicates that the potentiation of the ECoG activity is a real change that is induced by CSD, probably involving synaptic processes, which depend on the previous elicitation of the phenomenon in the cortical tissue and not on the duration of the ECoG recording. According to this idea, CSD would change the balance between excitatory and inhibitory mechanisms, thereby enhancing synaptic efficacy, as previously suggested [6, 17]. This finding is in line with the proposition that CSD could be related to phenomena that indicate brain excitability changes, such as long-term potentiation (LTP) [12]. In his initial study, Leão [9] observed that abnormal epileptiform EEG waves appeared during CSD, even with the spontaneous cortical activity being depressed, thereby suggesting that CSD can cause an increase in neural excitability and synaptic activity, as evidenced by increased amplitude of the ECoG [9]. Later, a causal association between CSD and an LTP-like potentiation of electrically evoked neocortical activity *in vitro* was described by Footitt and Newberry [12]. More recently, Faraguna and colleagues [17] used rats to demonstrate *in vivo* that the induction of CSD increased cortico-cortical evoked responses, thereby suggesting a synaptic potentiation after local induction of CSD. Corroborating these findings, in anesthetized and awake rats, our group demonstrated the potentiation of evoked and spontaneous electrical cortical activity (ECoG) following CSD [6-8]. Thus, it appears that this type of potentiation is a well-documented phenomenon that is caused by CSD. Interestingly, additional evidence also sustains the CSD/LTP relationship, as both phenomena can be induced by KCl [18] and neuronal depolarization and both involve the activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) channels, as well as potassium- and calcium-translocation [19].

Among the different mechanisms that could explain the present CSD potentiation effect, we postulate that two are likely to be involved and deserve special attention. First, because CSD has been associated with increased brain excitability and because the action of excitatory

amino acids is an important source of brain excitatory influences, we suggest its involvement via NMDA-linked mechanisms [20]. Second, we also suggest the participation of disinhibition mechanisms, which act upon feed forward inhibitory synapses [21]. These two mechanisms may not necessarily be mutually exclusive but rather could act together. Further investigations are warranted to test this hypothesis.

In comparison to the sedentary condition, swimming exercise reduced the post-CSD ECoG potentiation in the L₆, but not L₁₂, animals, which indicates an interaction between early swimming exercise and lactation condition. The maintenance of an adequate nutritional status, especially during early development, is extremely important given the consequences, particularly for the nervous system, of nutritional changes in childhood in later life [4]. It is known that nutritional deficiency affects brain function, including neuronal excitability [22]. Our data from the L₁₂ group are coherent with the above data from Bronzino and coworkers. In comparison to the L₆ rats, the body- and brain-weight reduction of the L₁₂ animals (Fig. 1), which is consequent to the increased competition for the maternal milk, confirms previous studies from our group [11]. Regarding CSD features, we previously demonstrated that L₁₂-induced nutritional deficiency facilitates CSD propagation in adulthood [11] and enhances the CSD-related ECoG potentiation [6]. The present study further extends those observations that demonstrate that nutritional deficiency can attenuate the effect of exercise on the ECoG potentiation that is caused by CSD (Fig. 3). The underlying mechanisms of such interactions shall be further investigated.

In conclusion, this study reinforces previous data regarding the ECoG potentiation that is induced by CSD and extends the findings to the role of swimming exercise early in life in reducing this effect in well-nourished (L₆) rats but not in nutritionally deficient rats (L₁₂). Our results enable us to draw three conclusions. First, exercise reduces the CSD-related ECoG potentiation. Second, early nutritional deficiency abolishes the attenuating effect of exercise

on ECoG potentiation, thereby suggesting an interaction between both factors. Third, these effects persist, which suggests a brain plasticity action. In view of the evidence relating to CSD and human neurological disorders [23], we consider that our findings might suggest an exercise/nutrition/brain excitability relationship during brain development. The search for the molecular mechanisms underlying this potentiation effect, as well as its importance for human health, shall be the subject of future investigations.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CAPES (AUXPE – CIMAR 1990/2014), CNPq (No. 445101/2014-8), MCT/FINEP/CT-INFRA – PROINFRA – 01/2008 for financial support. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 303636/2014-9).

References

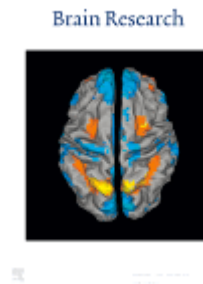
- [1] T. Zhong, F. Ren, C. S. Huang, W. Y. Zou, Y. Yang, Y. D. Pan, B. Sun, E. Wang, Q. L. Guo, Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice, *Neuroscience*. 316 (2016) 378–388.
- [2] M.A. Souza, M.S. Oliveira, A.F. Furian, L.M. Rambo, L.R. Ribeiro, F.D. Lima, L.C.D. Corte, L.F.A. Silva, L.T. Retamoso, C.L.D. Corte, G.O. Puntel, D.S. Avila, F.A.A. Soares, M.R. Figuera, C.F. Mello, L.F.F. Royes, Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress, *Epilepsia*. 50 (2009) 811–823.
- [3] R.C.A. Guedes, Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: V.R. Preedy, R.R. Watson, C.R. Martin, *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. 1 ed., Springer, London, 2011.
- [4] P.J. Morgane, M. Miller, T. Kemper, W. Ster, W. Forbes, R. Hall, J. Bronzino, J. Kissane, E. Hawlyrewicz, O. Resnick, The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2 (1978) 137-230.
- [5] M.L.Florian, M.L. Nunes, Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats, *Nutr. Neurosci.* 13 (2010) 265–273.
- [6] T.K.M. Souza, M.B. Silva, A.R. Gomes, H.M. Oliveira, R.B. Moraes, C.T. Freitas Barbosa, R.C.A. Guedes, Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats, *Exp. Brain Res.* 214 (2011) 463–469.

- [7] T.K.M. de Souza, M.B. e Silva-Gondim, M.C.A. Rodrigues, R.C.A. Guedes, Anesthetic agents modulate ECoG potentiation after spreading depression, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect, *Neurosci. Lett.* 592 (2015) 6-11.
- [8] A.A.C. Lopes-de-Morais, R.F. Mendes-da-Silva, E.M. Dos-Santos, E.M.; R.C.A. Guedes, Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect, *Brain Res.* 1591 (2014) 93-101.
- [9] A.A.P. Leão, Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J. Neurophysiol.* 7 (1944) 359–390.
- [10] A. Gorji, Spreading depression: a review of the clinical relevance, *Brain Res. Rev.* 38 (2001) 33–60.
- [11] A.P. Rocha-De-Melo, J.B. Cavalcanti, A.S. Barros, R.C.A. Guedes, Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and adulthood, *Nutr. Neurosci.* 9 (2006) 155-160.
- [12] D.R. Footitt, N.R. Newberry, Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro, *Brain Res.* (1998) 339–342.
- [13] J.A. Guendler, K.M.F.T. Barros, R.M.R. Alves, M.R. Melo-Júnior, T.J.B.M. França, J.L.S.A. Filho, N.T. Pontes-Filho, Efeitos da natação precoce sobre o córtex motor de ratos desnutridos, *Neurobiologia.* 71 (2008) 75-85.
- [14] C.B. Lima, G.S.F. Soares, S. Marcele-Vitor, B. Castellano, B.L.S. Andrade-da-Costa, R.C.A. Guedes, Spreading depression features and Iba 1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate, *Internat. J. Devel. Neurosci.* 33 (2014) 98-105.
- [15] E. Tutkun, M. Ayyildiz, E. Agar, Short-duration swimming exercise decreases penicillin induced epileptiform ECoG activity in rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 70 (2010) 382–389.

- [16] J. Santos-Monteiro, N.R. Teodósio, R.C.A. Guedes, Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats, *Nutr. Neurosci.* 3 (2000) 29–40.
- [17] U. Faraguna, A. Nelson, V.V. Vyazovskiy, C. Cirelli, G. Tononi, Unilateral cortical spreading depression affects sleep need and induces molecular and electrophysiological signs of synaptic potentiation in vivo, *Cereb. Cortex.* 20 (2010) 2939–2947.
- [18] J. Bernard, A. Lahsaini, G. Massicote, Potassium-induced long-term potentiation in area CA1 of the hippocampus involves phospholipase activation, *Hippocampus.* 4 (1994) 447–453.
- [19] G.G. Somjen, P.G. Aitken, G.L. Czech, O. Herrera, J.I. Jing, J.N. Young, Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70 (1992) 248–254.
- [20] T.P. Hicks, F. Conti, Amino acids as the source of considerable excitation in cerebral cortex, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74 (1996) 341–361.
- [21] L.L. McMahon, J.A. Kauer, Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity, *Neuron.* 18 (1997) 295–305.
- [22] J.D. Bronzino, J.H. Blaise, D.J. Mokler, J.R. Galler, P.J. Morgane, Modulation of paired-pulse responses in the dentate gyrus: effects of prenatal protein malnutrition, *Brain Res.* 849 (1999). 45–57.
- [23] M. Lauritzen, J.P. Dreier, M. Fabricius, J.A. Hartings, R. Graf, A.J. Strong, Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 31 (2011) 17–35.

APÊNDICE C – Artigo 2

Title: Swimming exercise in adult rats that were previously suckled under different litter sizes: effects on the electrocorticogram potentiation after spreading depression.



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

Affiliation: ^aLaboratory of Nutrition Physiology, Departamento de Nutrição,
Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de
Pernambuco, 50740-600 Recife, PE, Brazil

^{CA} = **Corresponding Author:** Rubem C. A. Guedes, MD, PhD

Av. Prof. Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, Recife - PE – Brazil

CEP: 50670-901 Phone: +55 81 21268936 Fax: +55 81 21268473

Email: guedes.rca@gmail.com or rguedes@ufpe.br

Abstract

Physical exercise and favorable nutrition can improve brain function both in early life and in adulthood. In adult organisms, studies on the beneficial effects of exercise include behavioral, neurochemical, and brain excitability and electrophysiological parameters. In this study we investigated in adult rats whether lactation conditions and swimming exercise at adulthood interact and modulate brain electrophysiology as indexed by the potentiation of the electrocorticogram that is caused by cortical spreading depression (CSD). Male Wistar rats were suckled in litters with 6 or 12 pups (L_6 and L_{12} groups). At postnatal days (P) 60-75, the animals were subjected to swimming exercise, or remained sedentary. At P90-120 days, a "baseline" ECoG was recorded for 2 h on two points of the cortical surface. Following the baseline recording, CSD was elicited every 30 min for more 2 h. The mean amplitude of the ECoG waves, before and after CSD, was calculated with help of an algorithm implemented in Matlab™. In comparison to baseline values, ECoG amplitudes after CSD increased 18%-39% for all experimental conditions ($p < 0.05$). In the L_6 condition, but not the L_{12} condition, swimming enhanced the post-CSD ECoG potentiation in comparison to the L_6 sedentary group ($p < 0.05$). The results confirm the CSD-associated ECoG potentiation, and specify that swimming exercise in adulthood enhanced this effect in the L_6 , but not L_{12} group, suggesting an interaction between lactation conditions and later swimming exercise. Data may have potential implications for the excitability-dependent mechanisms underlying CSD-correlated neurological diseases, such as epilepsy.

Keywords: Swimming exercise; Litter size; Brain excitability; Cortical spreading depression; Electroencephalogram; Rat.

1. Introduction

Physical exercise has unquestionable beneficial action on human health (Dhuria and Sharma, 2015) including favorable effects on brain development and functioning (Souza et al., 2009; Zhong et al., 2016) and attenuation of the neural effects associated with aging (Batista-de-Oliveira et al., 2012; Berchicci et al., 2013). Also, data on the effect of physical exercise on the brain indicate an influence on brain excitability, on neuroprotection, brain health and improvement of long-term functioning (Reiss et al., 2009; Zhang et al., 2013). However, the interaction between swimming exercise at adulthood and other factors, such as nutritional deficiency early in life, has not been much investigated. In rats, increasing litter size at the lactation period can easily impair the nutritional status (Rocha-de-Melo et al., 2006). Early malnutrition can alter physiological processes such as consciousness, cognition, learning, memory, emotion and brain excitability (Morgane et al., 1978).

In this study, we subjected newborn rats to different lactation conditions and, at adulthood, to swimming exercise, and we investigated the effect of the interaction between the two factors on the brain electrical activity. We analyzed the potentiation of the electrocorticogram (ECoG) that is caused by the excitability-related phenomenon that is known as cortical spreading depression (CSD) (Lopes-de-Morais et al., 2014; Souza et al., 2015, 2011). CSD is a reversible and slowly propagating wave of reduction of cortical electrical activity that is accompanied by neuronal depolarization. CSD occurs in response to electrical, chemical or mechanical stimulation of one point on the cortical tissue (Dreier, 2011; Leão, 1944). Simultaneous to this depression, a slow negative DC-potential change appears in the brain region invaded by the phenomenon, and this "all or none" signal is the hallmark of CSD (Guedes, 2011; Leão, 1947). The

clinical importance of CSD is based on its relationship with important human neurological diseases, such as epilepsy, migraine, traumatic brain injury, and cerebral ischemia (Dreier, 2011; Lauritzen et al., 2011; Wei et al., 2014).

During CSD, although spontaneous ECoG activity is depressed, abnormal, high-amplitude "epileptiform waves" can appear (Leão, 1944), suggesting a CSD-linked increase in neuronal excitability, probably via enhancement of the synaptic activity (Footitt and Newberry, 1998). This suggests a relationship between CSD and phenomena related to neuronal excitability as the long-term potentiation (LTP) phenomenon. This association was evidenced in rats *in vitro* (Footitt and Newberry, 1998) and *in vivo* (Faraguna et al., 2010; Souza et al., 2011), as well as in human brain tissue *in vitro* (Gorji and Speckman, 2004). However, no information is available on CSD-related ECoG potentiation, regarding the interaction between nutritional deficiencies early in life and swimming exercise at adulthood. Previous studies demonstrated that CSD is accelerated in early-malnourished adult rats (Guedes, 2011; Rocha-de-Melo et al., 2006), and decelerated in animals subjected to treadmill exercise (Lima et al., 2014) in comparison respectively with well-nourished and sedentary controls. Thus, in view of the importance of the two factors for the human health, and the scarcity of studies analyzing the brain electrophysiological effects of the 'nutrition-exercise' association, we decided to investigate the effect of this interaction on the ECoG potentiation that is caused by CSD (Souza et al., 2015; 2011). In this context, we hypothesized that (1) swimming exercise in adult life influences the post-CSD ECoG potentiation effect and (2) nutritional deficiency during the lactation period interacts with exercise and modulate this effect.

2. Results

2.1. Manipulation of litter size and body- and brain-weight changes

Compared with the L₆ groups, the L₁₂ condition display significantly ($p < 0.05$) lower body- and brain-weights, with body weights being different from P7 to P90. The average percent body weight reduction was $17.9 \pm 8.7\%$ for sedentary and $15.8 \pm 8.6\%$ for exercised animals. The average brain weight reduction was $17.3 \pm 1.4\%$ for sedentary and $13.0 \pm 3.0\%$ for exercised rats.

Comparing the exercised groups with their sedentary controls on the same lactation condition, we concluded that exercise had no effect on body- and brain-weight, since there was no difference between exercised and sedentary, neither in the L₆, nor in the L₁₂ condition. Data on body- and brain-weights are summarized in Figure 1.

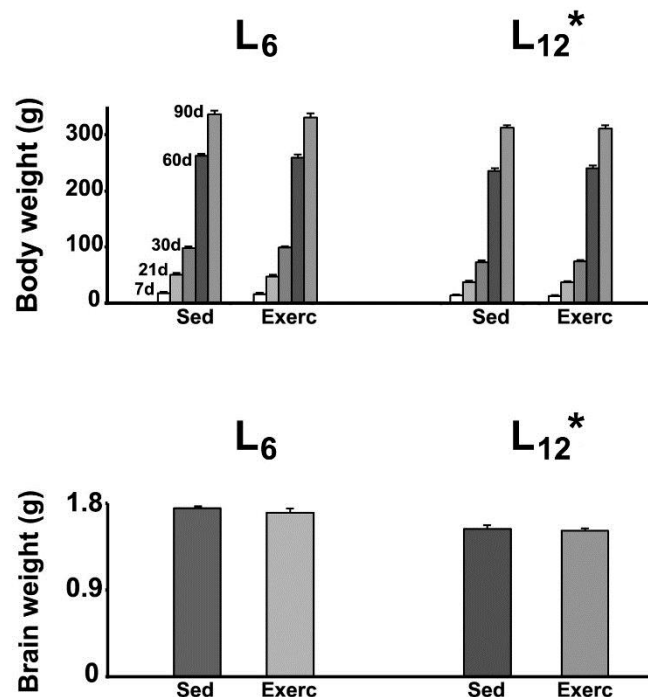


Figure 1. Body- and Brain-weights of Exercised (Exerc) and Sedentary (Sed) rats suckled in litters with 6 or 12 pups, constituting the two different lactation conditions (respectively denominated L₆, and L₁₂). Body weights (upper panel) were measured on postnatal days 7, 21, 30, 60 and 90. Brain weights (lower panel) are from rats at 90-120 days of age. Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean. Data are from 13 and 9

exercised and 13 and 10 sedentary animals, for the L₆ and L₁₂ groups, respectively. The asterisks indicate that L₁₂ values are significantly lower than those of the corresponding L₆ groups ($p < 0.05$; two-way ANOVA, followed by Holm-Sidak test).

2.2. CSD-related potentiation of the ECoG

In all experimental groups, in both recording points (denominated ‘near’ [n] and ‘remote’ [r] in relation to the CSD elicitation point) the values for the ECoG amplitude in the final period (last 2 h of recording, when the cortical tissue suffered four CSD episodes) were significantly higher ($p < 0.05$) than those of the Initial period (first 2 h, previous to CSD elicitation). Representative ECoG recordings and quantitative data on CSD-related ECoG potentiation of these groups are presented in Fig. 2.

In comparison with the baseline ECoG amplitudes, under the L₆ condition the post-CSD ECoG amplitude displayed a percent increase of $38.6\% \pm 13.8\%$ (sedentary) and $39.4\% \pm 14.0\%$ (exercised) for the recording point **n**, and $18.2\% \pm 6.2\%$ (sedentary) and $39.0\% \pm 7.6\%$ (exercised) for the point **r**. Under the L₁₂ condition, the percent ECoG enhancement for the recording point **n** was $26.5\% \pm 6.5\%$ (sedentary) and $27.4\% \pm 12.2\%$ (exercised); for the point **r**, $26.7\% \pm 12.5\%$ (sedentary) and $19.3\% \pm 7.0\%$ (exercised). The comparison between sedentary and exercised groups suggested an interaction between the factors "lactation condition" and "swimming exercise", in recording point **r**. L₆ exercised animals exhibited an ECoG potentiation with higher magnitude ($p < 0.05$) than the L₆ sedentary and the L₁₂ exercised rats (Fig. 2).

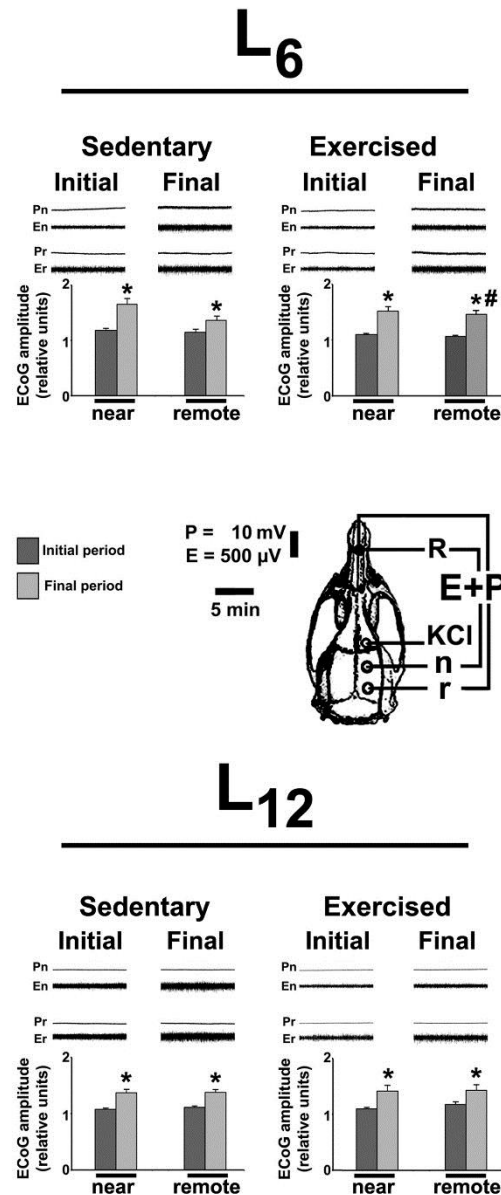


Fig. 2. Examples of spontaneous cortical electrical activity (Electrocorticogram - E) and DC-potential (P) recordings on the right hemispheres of four rats at 90–120 days of age from the L₆ (upper panel) and L₁₂ (lower panel) groups. Traces in the final period were taken at the following temporal intervals (t) after beginning CSD elicitation: L₆ sedentary, t=95 min (after the 4th CSD episode had been elicited); L₆ exercised, t=50 min (after the 2nd CSD episode); L₁₂ sedentary, t=45 min (after the 2nd CSD episode); L₁₂ exercised, t=95 min (after the 4th CSD episode). The bar graphs represent the ECOG amplitude (mean $\pm$ standard error of the mean) in relative units (the lowest value was considered equal to 1) for 13 sedentary and 13 exercised rats of the L₆ group, and 9 sedentary and 10 exercised animals of the L₁₂ group. The diagram of the skull indicates the positions of the common reference electrode (**R**), the place of **KCl** application to elicit CSD, and the near (**n**) and remote (**r**) recording locations (in relation to the stimulating point). *= higher ECOG amplitudes compared with the initial

period ($p < 0.05$; paired t-test). The symbol # indicates that the potentiation percentage of the L_6 exercised group, at the **r** recording point, was higher than their sedentary control (L_6) and the L_{12} exercised group ($p < 0.05$; two way ANOVA followed by Holm-Sidak test).

In the two additional groups, in which 4 hours of ECoG recording elapsed without CSD deflagration (CSD-free groups), no ECoG amplitude increase was observed. (Fig. 3).

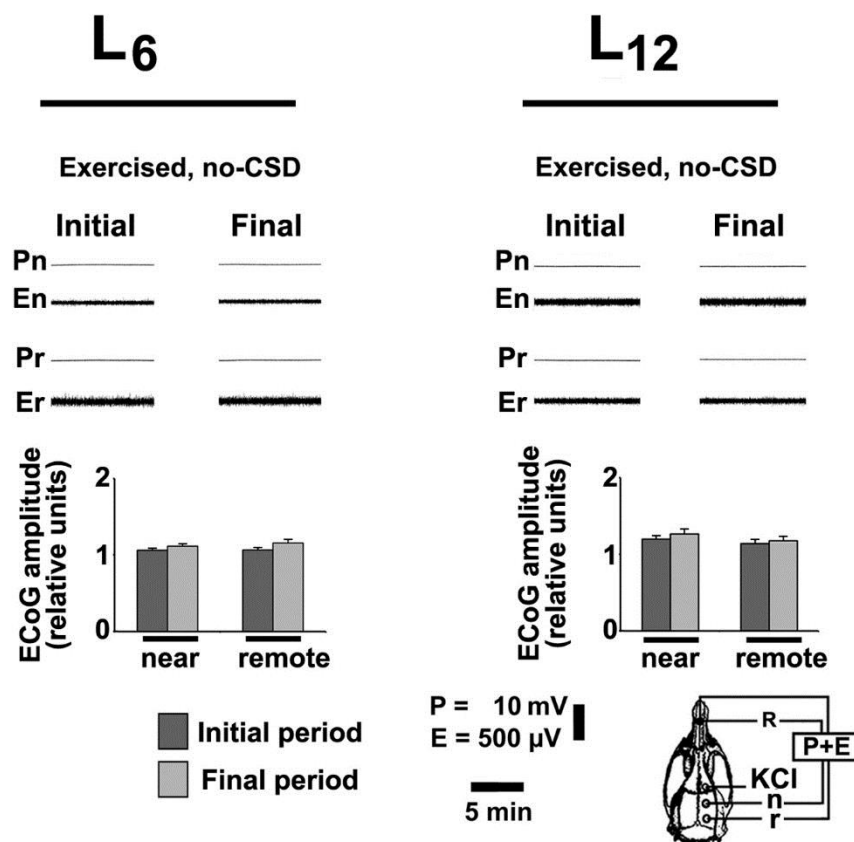


Fig. 3- Examples of ECoG (E) and DC-potential (P) recordings on the right hemispheres of two rats at 90–120 days of age from the L_6 (left) and L_{12} (right) groups that did not undergo CSD (CSD-free groups). The diagram of the skull indicates the positions of the common reference electrode (R) and the near (n) and remote (r) recording locations (in relation to the stimulating point). In these two groups, no KCl stimulation was applied, and no potentiation of the ECoG amplitude was observed. The ECoG, recorded continuously over 4 h, confirmed that these animals were CSD-free.

3. Discussion

In recent years, the relationship between nutrition, exercise and health status of individuals has received increasing attention from the scientific community. A good nutritional status and the practice of physical exercise are two factors that produce positive effects on the nervous system and can improve brain development and function throughout life (Guedes, 2011; Guendler et al., 2008; Vedovelli et al., 2011). In this study, we provide the first assessment of the interaction of the two factors on the CSD-related ECoG potentiation. We demonstrated for the first time that swimming exercise in quite developed rats (P60–75), clearly increased the ECoG potentiation that occurs after CSD, and unfavorable lactation attenuated the exercise effect. Because the potentiation was measured on adulthood (P90–120), we suggest that the effect of the unfavorable lactation on CSD-related ECoG potentiation is permanent, as suggested regarding other neural effects of early malnutrition (Guedes, 2011; Morgane et al., 1978). In the CSD-free group (Fig. 3), we found no potentiation, which demonstrates that the ECoG potentiation is not an effect that depends on the time elapsed since the beginning of the recording; rather, ECoG potentiation results from the action of CSD on cortical tissue, probably representing a real synaptic change induced by CSD (Faraguna et al., 2010; Souza et al., 2015).

We employed the swimming paradigm, as a model of exercise in rats, for three main reasons: first, the positive effects of swimming on brain function are well established (Ko et al., 2013; Zhong et al., 2016); second, despite that, little is known about swimming influence on the enhancement of brain electrical activity induced by CSD in the cerebral cortex; third, the swimming paradigm presents advantages over treadmill running, since swimming is a natural ability of the rats and this avoids the selection of animals, which is necessary in experimental protocols using treadmill running (Kevin et al., 2006). Experimental evidence

demonstrates that the practice of exercise in adult life is associated with improved cognitive function, learning and memory (Ryan and Nolan, 2015; Zhong et al., 2016). The molecular mechanism that underlies the action of swimming exercise on CSD remains unclear. According to current evidence, the effects of exercise on the brain can be mediated by processes such as increase in brain angiogenesis (Huang et al., 2013), enhancement of hippocampal neurogenesis (Yau et al., 2014) and dendritic remodeling, which may contribute to brain plasticity (Yau et al., 2011). Interestingly, O'Callaghan et al. (2007) evidenced in adult rats that forced treadmill running selectively improved hippocampal plasticity, with the greatest expression of long term potentiation in the dentate gyrus. In line with this study, we demonstrated a higher CSD-induced ECoG potentiation in the adult rats that were subjected to swimming exercise, which suggests that swimming exercise at adult age can influence brain electrophysiological parameters.

Increasing the number of pups to be suckled by one dam can lead to malnutrition (Rocha-de-Melo et al., 2006). In line with those results, our L₁₂ rats weighed significantly less and displayed significantly lower brain weight than those of the L₆ groups. This may be caused by the insufficiency of the dam's milk in face of the great number of pups leading to failure in adequately nourishing those pups (Lopes-de-Morais et al., 2014).

Links have been suggested between CSD and important neurological human disorders, such as epilepsy, migraine, and traumatic brain injury (Dreier et al., 2012; Nosedá and Burstein, 2013; Torrente et al., 2014). In adult rats, swimming exercise partially inhibits penicillin-induced epileptiform activity (Tutkun et al., 2010), which is interesting in view of our findings on CSD-related potentiation of the ECoG. Therefore, we think that it is critical to understand how common interventions, such as swimming exercise, can affect brain electrical activity in the adult brain.

Although our findings can be explained by several mechanisms, we suggest that two factors are most likely involved: the glutamatergic system and oxidative stress. In the cortex, activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors is required for LTP production (Bear and Kirkwood, 1993). CSD itself induces prolonged depolarization, activates NMDA channels, and increases intracellular calcium and extracellular potassium (Somjen et al., 1992). Interestingly, both LTP (Bernard et al., 1994) and CSD (Souza et al., 2015) can be induced by brief exposure to KCl. Thus, in view of previous evidence in favor of it (Footitt and Newberry, 1998), it is not surprised that CSD induces potentiation of neuronal activity, which is similar to LTP (Guedes et al., 2005). We suggest that CSD modifies the fine balance between excitatory (NMDA-linked) and inhibitory (GABAergic and serotonergic) mechanisms, enhancing synaptic efficacy and generating ECoG potentiation, as previously highlighted (Guedes et al., 2005; Faraguna et al., 2010; Souza et al., 2011).

Glutamate transporter inhibitors and anti-oxidant molecules exert a blocking action on the glutamate toxic effects (Park et al., 2014; Patel et al., 2015). The beneficial effects of exercise on oxidative stress are well documented. Recently, behavioral and biochemical evidence indicated that treadmill exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial function, decreasing oxidative stress and apoptotic related markers (Marques-Aleixo et al., 2015), and corroborated the importance of redox mechanisms in the neuroprotective effect of physical exercise (García-Mesa et al., 2016). Regarding the relationship between exercise, oxidative stress and CSD, we can speculate based on CSD studies of mechanisms that are proposed to be also implicated in the neural actions of exercise. Some authors have suggested that oxidative stress may be the primary cause, rather than the consequence of CSD (Malkov et al., 2014). Treadmill exercise decreases CSD propagation velocity and enhances cortical microglia reaction, as evidenced by increases in Iba1 immunolabeling of microglial cells in the cortex that underwent CSD (Lima et al., 2014).

Reactive oxygen species can elicit CSD in vitro (Netto and Martins-Ferreira, 1989) and in vivo (El-Bacha et al., 1998). Antioxidant molecules such as astaxanthin (Abadie-Guedes et al., 2012; 2008) and tocopherol (Abadie-Guedes et al., 2016) impair the ethanol facilitating effect on CSD propagation that is due to the production of reactive oxygen species (Abadie-Guedes et al., 2008). We conclude that both mechanisms – NMDA-related and oxidative stress – can contribute in generating neurotoxicity, which seems to be counteracted by swimming exercise. However, at that point we cannot exclude the possibility of involvement of other processes such as glial activity (Largo et al., 1997) and myelination (Merkler et al., 2009), which influence CSD.

We found that CSD-related ECoG potentiation occurred with higher intensity in the exercised rats, at the cortical recording point remote from the CSD elicitation site, in comparison with the near recording point, suggesting a cortical regional difference in the modulatory effects of the swimming exercise. Furthermore, this regional difference on ECoG potentiation occurred in the L6, but not in the L12 condition, indicating that early nutritional deficiency affected the potentiation effect. Interestingly, Miyazawa et al. (2010) have reported regional brain differences under specific nutrient deficiency. Regarding CSD, distinct brain regions react differently to pharmacological challenges (Bogdanov et al., 2011). Regarding LTP, regional differences in the visual cortex were reported in rats (Kuo and Dringenberg, 2012). In addition, regional differences in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and spine density in the rat brain were recently reported (Yang, et al., 2015). Data collectively support the existence of different responsivity to CSD-related ECoG potentiation, exercise and malnutrition in distinct cortical regions (Souza et al., 2011). It is also interesting to consider that, in the human brain, a regional difference in EEG functional connectivity has been reported in very low birth-weight, in comparison with eutrophic term infants (Grieve et al., 2008).

In conclusion, the present *in vivo* study confirms the existence of the ECoG potentiation of the cortical electrical activity associated with the CSD phenomenon. Data also provide evidence of a novel effect, namely enhancement of the potentiation in rats that were subjected to swimming exercise in adult life, and this enhancement is modulated by unfavorable lactation, suggesting an imbalance between cortical excitation and inhibition mechanisms that is nutrition-related and modulates brain excitability in a cortical regional way. Our findings might advance understanding of the exercise/brain excitability/nutrition relationship in the adult brain, in view of the evidence linking CSD and excitability-related human diseases (Dreier, 2011).

4. Experimental procedure

4.1. Animals and lactation conditions

All experiments were conducted in conformance with the approval by the Ethics Committee for Animal Experiments of our university (approval protocol number 23076.017295/2012-17), which complies with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Male newborn Wistar rats from the colony of Departamento de Nutrição of Universidade Federal de Pernambuco/Brazil, were randomly distributed to be suckled in litters formed by 6 pups (Group L₆; n=26) or 12 pups (Group L₁₂; n=19) originating two distinct lactation conditions. The increase in the number of pups to be suckled by one dam (L₁₂ condition) induces a nutritional deficiency, determined by the competition for the maternal milk, as previously described (Batista-de-Oliveira et al., 2012; Maia et al., 2006; Rocha-de-Melo et al., 2006).

The animals were maintained in polypropylene cages (51 cm x 35.5 cm x 18.5 cm) in rooms with controlled temperature (23 ± 1 °C) and in a light/dark cycle of 12/12h (light phase beginning at 6:00 a.m.), with free access to water and food (commercial laboratory chow diet with 23% protein; Purina do Brasil Ltda). Body weights were measured at postnatal (P) days 7, 21, 30, 60 and 90 and Brain weights at the end of electrophysiological record (P90-120).

4.2. Swimming exercise

Swimming was performed from P60 to P75 according to the protocol described by Guendler and colleagues (Guendler et al., 2008). Thirteen L₆ and 9 L₁₂ rats were randomly selected and subjected to a program consisting of free daily swimming sessions. The remaining thirteen L₆ and ten L₁₂ rats constituted the sedentary controls, thereby forming the four groups of this study.

The exercised rats were subjected to swimming, in a plastic box measuring 50cm in diameter and with a capacity of 50 liters. Animals swam without additional resistance on paws or tail, and the swimming session occurred always between 8:00 and 12:00 am. The water of the swimming tank was preheated and maintained at a temperature of $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The level of water was maintained so as not to allow the animal's paws to touch the bottom of the swimming box. From P60 to P62, we subjected the animals to an initial adaptation to the aquatic environment, when they remained in the water tank for 2 min, 5 min and 10 min, respectively. The animals rested on P63 and P64,, and from P65 to P69 progressively swam during 15, 20, 25, 30 and 40 minutes/day. They rested on P70 and P71 and swam 40 minutes/day from P72 to P75. After each swimming session, the animals were dried, warmed and returned to their cages.

Sedentary animals of the same age-range served as controls. The control rats were placed in the same tank, according to the same protocol; however, the water level was kept

low, such that the animal did not have to swim, but underwent the same type of confinement and water stress.

4.3. Electrophysiological Record

When the animals were 90–120 days old, they were intraperitoneally anesthetized with a mixture of 1000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (Sigma; 10 ml/kg). We drilled three holes at the level of the right cerebral hemisphere, lined up in the frontal-to-occipital direction and parallel to the midline. The first orifice (2mm diameter) drilled at the frontal bone, was used for stimulation with 2% potassium chloride solution, necessary to elicit CSD. The two other holes (2-3mm diameter) drilled on the parietal bone, served as recording places and were designated, respectively, as **n** (near) and **r** (remote) recording points, in relation to the CSD elicitation point (see skull diagram in Fig. 2).

CSD was recorded using three electrodes of the "silver-silver chloride, agar-Ringer" type, prepared in our laboratory as previously described (Lima et al., 2014). Briefly, a pair of such Ag–AgCl agar-Ringer electrode was placed in contact with the cortical surface. A third electrode of the same type was placed on the nasal bone and used as a common reference electrode. The slow potential change accompanying CSD and the ECoG were continuously recorded on the cortical surface, for 4 hours, through a digital recording system (Biopac MP 100, USA).

In the first two recording hours ("initial period"), no KCl stimulus was applied and consequently no CSD was elicited. In the last two recording hours ("final period") four CSD episodes were elicited at 30-min intervals by 1-min cortical stimulation with 2% KCl. We maintained the same gain of the amplifiers over the course of the entire recording session.

As the basis for assessing the occurrence of potentiation of spontaneous electrical activity, in each animal we compared the amplitudes of ECoG before and after starting to

elicit CSD. During the recording period, the animal was maintained on an electric heater such that rectal temperature remained stable ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and could be adjusted when necessary.

In order to exclude the possibility that the ECoG activity was potentiated by the duration of the ECoG recording, in two additional exercised groups (L_6 ; $n=8$ and L_{12} ; $n=12$), ECoG was performed during 4h without CSD elicitation (no KCl stimulus was applied).

At the end of the ECoG recording session, the still anesthetized animal was subjected to euthanasia (by lesioning the bulbar region with subsequent cardio-respiratory arrest) and the brain was immediately removed and weighed.

4.4. Quantitative analysis of cortical electrical signals

ECoG samples of approximately 10 min were analyzed at four time points of electrophysiological record: two in the initial period and two at the final period. These samples were analyzed off-line, with the aid of an algorithm implemented on the software MATLABTM, version R2011b, which calculates the ECoG average amplitudes. From these values we proceeded to data normalization stage, with a unitary value assigned to the lowest amplitude. For each animal, the ECoG amplitude values were normalized, expressed in relative units and compared in the same animal, before and after the elicitation of CSD, as a basis for analyzing the occurrence of spontaneous electrical activity potentiation. Significant amplitude increase in the final period was considered evidence of CSD-linked ECoG potentiation. (Souza et al., 2015, 2011).

4.5. Statistical analysis

Intra-group amplitude differences in the spontaneous cortical activity (amplitudes before *versus* after CSD in the same animal) were analyzed with Student's paired t-test. The inter-group differences (ECoG amplitudes, Body- and Brain weights) were analyzed using a

two-way analysis of variance (ANOVA) including lactation condition (L_6 and L_{12}), and exercise (i.e., swimming and sedentary) as factors. This was followed by a post hoc (Holm–Sidak) test, where indicated. Differences were accepted as significant when $p < 0.05$.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CAPES (AUXPE – CIMAR 1990/2014), CNPq (No. 445101/2014-8), MCT/FINEP/CT-INFRA – PROINFRA – 01/2008 for financial support. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 303636/2014-9).

References

- Abadie-Guedes, R., Bezerra, R.S., Guedes, R.C.A., 2016. Alpha-tocopherol counteracts the effect of ethanol on cortical spreading depression in rats of various ages, with and without ethanol abstinence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* In press, doi: 10.1111/acer.12998
- Abadie-Guedes, R., Guedes, R.C., Bezerra, R.S., 2012. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 36, 1563-1567.
- Abadie-Guedes, R., Santos, S.D., Cahú, T.B., Guedes, R.C., de Souza Bezerra, R., 2008. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 32, 1417-1421.
- Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A.C., Mendes-da-Silva, R.F., Guedes R.C.A., 2012. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. *Exp. Gerontol.* 47, 452–457.
- Bear, M.F., Kirkwood, A., 1993. Neocortical long-term potentiation. *Current Opinion in Neurobiology.* 3, 197-202.
- Berchicci, M., Lucci, G., Di Russo, F., 2013. Benefits of Physical Exercise on the Aging Brain: The Role of the Prefrontal Cortex. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 68 (11), 1337-1341.
- 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.* 41,430-5.

- Dhutia, H., Sharma, S., 2015. Playing it safe: exercise and cardiovascular health. *Practitioner*. 259(1786), 15-20.
- Dreier, J., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439–447.
- Dreier, J.P., Major, S., Pannek, H.W., Woitzik, J., Scheel, M., Wiesenthal, D., Martus, P., Winkler, M.K., Hartings, J.A., Fabricius, M., Speckmann, E.J., Gorji, A., 2012. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain* 35 (Pt 1), 259–275.
- El-Bachá, R.S., Lima-filho, J.L., Guedes, R.C.A., 1998. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. *Nutr. Neurosci.* 1, 205–212.
- Faraguna, U., Nelson, A., Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Tononi, G., 2010. Unilateral cortical spreading depression affects sleep need and induces molecular and electrophysiological signs of synaptic potentiation in vivo. *Cereb. Cortex.* 20, 2939-2947.
- Footitt, D.R., Newberry, N.R., 1998. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain Res.* 781, 339-342.
- García-Mesa, Y., Colie, S., Corpas, R., Cristòfol, R., Comellas, F., Nebreda, A.R., Giménez-Llort, L., Sanfeliu, C., 2016. Oxidative Stress Is a Central Target for Physical Exercise Neuroprotection Against Pathological Brain Aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 71, 40–49.
- Gorji, A., Speckmann, E., 2004. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3371-3374.
- 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., 2011. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy; Ronald R Watson; Colin R Martin. (Org.). Handbook of Behavior, Food and Nutrition. London: Springer, pp. 2343-2355.
- 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.
- Guendler, J.A., Barros, K.M.F.T., Alves, R.M.R., Melo-Júnior, M.R., França, T.J.B.M., Filho, J.L.S.A., Pontes-Filho, N.T., 2008. Efeitos da natação precoce sobre o córtex motor de ratos desnutridos. *Neurobiologia.* 71, (3), 75-85.
- Huang, C.X., Qiu, X., Wang, S., Wu, H., Xia, L., Li, C., Gao, Y., Zhang, L., Xiu, Y., Chao, F., Tang, Y., 2013. Exercise-induced changes of the capillaries in the cortex of middle-aged rats. *Neuroscience.* 233:139-145. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.046.
- Kevin C.K., David L.A., Frank W.B., Monika R.F., Erik J.H., Timothy I.M., Donal S.O., Christine M.P., David C.P., Alice W.R., Don D.S., Michael S.S., Linda A.T., 2006. Exercise protocols using rats and mice. In: Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. American Physiological Society. pp. 23-58.
- Kuo, M.-C., Dringenberg, H.C., 2012. Comparison of long-term potentiation (LTP) in the medial (monocular) and lateral (binocular) rat primary visual cortex. *Brain Res.* 1488, 51-59.
- 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.
- Lauritzen, M., Dreier, J.P., Fabricius, M., Hartings, J.A., Graf, R., Strong, A.J., 2011. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 31, 17–35.

- Leão, A.A.P., 1947. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J. Neurophysiol.* 10, 409–414.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359-390.
- Lima, C.B., Soares, G.S.F., Marcele-Vitor, S., Castellano, B., Andrade-Da-Costa, B.L.S., Guedes, R.C.A., 2014. Spreading depression features and Iba 1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. *Int. J. Dev. Neurosci.* 33, 98-105.
- Lopes-De-Morais, A.A.C., Mendes-Da-Silva, R.F., Dos-Santos, E.M., Guedes, R.C.A., 2014. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. *Brain Res.* 1591, 93-101.
- Maia, L.M.S.S., Frazao, M.F., Silva, M.B., Souza, T.K.M., Rocha De Melo, A.P., Santos, A.A., Picanço Diniz, C.W., Guedes, R.C.A., 2006. L- arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. *Brain Res.* 1072, 19-25.
- Malkov, A., Ivanov, A.I., Popova, I., Mukhtarov, M., Gubkina, O., Waseem, T., Bregestovski, P., Zilberter, Y., 2014. Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1540–1549. doi: 10.1038/jcbfm.2014.121.
- Marques-Aleixo, I., Santos-Alves, E., Balça, M.M., Moreira, P.I., Oliveira, P.J., Magalhães, J., Ascensão, A., 2015. Physical exercise mitigates doxorubicin-induced brain cortex and cerebellum mitochondrial alterations and cellular quality control signaling. *Mitochondrion.* 26, 43-57.
- Merkler, D., Klinker, F., Jürgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B.G., Sereda, M., Guedes, R.C.A., Stadelmann-Nessler, C., Brück, W., Liebetanz, D., 2009. Propagation

- of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.* 66, 355-365.
- Miyazawa, D., Yasui, Y., Yamada, K., Ohara, N., Okuyama, H., 2010. Regional differences of the mouse brain in response to an α -linolenic acid-restricted diet: Neurotrophin content and protein kinase activity. *Life Sci.* 87, 490–494.
- Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A., 2007. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res. Rev.* 55, 78-88.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawlyrewicz, E., Resnick, O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2, 137-230.
- Netto, M., Martins-Ferreira, H., 1989. Elicitation of spreading depression by rose Bengal photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 50, 229–234.
- Nosedá, R., Burstein, R., 2013. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, CSD, sensitization and modulation of pain. *Pain* 154 (Suppl 1), S44–S53.
- O'Callaghan, R.M., Ohle, R., Kelly, A.M., 2007. The effect of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav. Brain Res.* 176, 362-366.
- Park, E., Yu, K.H., Kim, K., Kim, S., Sapkota, K., Kim, S.J., Kim, C.S., Chun, H.S., 2015. Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death. *Food Chem. Toxicol.* 67, 1–9.
- Patel, D., Kharkar, P.S., Nandave, M., 2015. Emerging roles of system [Formula: see text] antiporter and its inhibition in CNS disorders, *Mol. Membr. Biol.* 32, 89-116.

- Reiss, J.I., Dishman, R.K., Boyd, H.E., Robinson, J.K., Holmes, P.V., 2009. Chronic activity wheel running reduces the severity of kainic acid-induced seizures in the rat: Possible role of galanin. *Brain Res.* 1266, 54–63.
- 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 adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9, 155-160.
- Ryan, S.M., Nolan, Y.M., 2015. Neuroinflammation negatively affects adult hippocampal neurogenesis and cognition: can exercise compensate? *Neurosci Biobehav Rev.* 61, 121-131.
- Somjen, G.G., Aitken, P.G., Czech, G.L., Herrera, O., Jing, J.I., Young, J.N., 1992. Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, 248-254.
- Souza, T.K.M., Silva-Gondim, M.B., Rodrigues, M.C.A., Guedes, R.C.A., 2015. Anesthetic agents modulate ECoG potentiation after spreading depression, and insulin-induced hypoglycemia does not modify this effect. *Neurosci. Lett.* 592, 6-11.
- Souza, T.K.M., Silva, M.B., Gomes, A.R., Oliveira, H.M., Moraes, R.B., Freitas Barbosa, C.T., Guedes, R.C.A., 2011. Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats. *Exp. Brain Res.* 214, 463-469.
- Souza, M.A., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., Corte, L.C.D., Silva, L.F.A., Retamoso, L.T., Corte, C.L.D., Puntel, G.O., Avila, D.S., Soares, F.A.A., Fighera, M.R., Mello, C.F., Royes, L.F.F., 2009. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia.* 50, 811–823.

- Torrente, T., Cabezas, R., Avila, M.F., García-Segura, L.M., Barreto, G.E., Guedes, R.C.A., 2014. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? *Neurosci. Lett.* 565, 2-6.
- Tutkun, E., Ayyildiz, M., Agar, E., 2010. Short-duration swimming exercise decreases penicillin induced epileptiform ECoG activity in rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 70, 382–389.
- Vedovelli K., Silveira, E., Velho, E., Stertz, L., Kapczinski, F., Schoroder, N., Bromberg, E., 2011. Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. *Neuroscience.* 199, 284-291.
- Wei, Y., Ullah, G., Schiff, S.J., 2014. Unification of neuronal spikes, seizures, and spreading depression. *J. Neurosci.* 35, 11733-11743.
- Yang, C., Shirayama, Y., Zhang, J.C., Ren, Q., Hashimoto, K., 2015. Regional differences in brain-derived neurotrophic factor and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, (7) doi: 10.1093/ijnp/pyu121
- Yau, S.Y., Gil-Mohapel, J., Christie, B.R., So, K.F., 2014. Physical exercise-induced adult neurogenesis: a good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? *Biomed. Res. Int.* Article ID 403120, 20 pages. doi:10.1155/2014/403120.
- Yau, S.Y., Lau, B.W., Tong, J.B., Wong, R., Ching, Y.P., Qiu, G., Tang, S.W., Lee, T.M., So, K.F., 2011. Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behavior in stressed rats. *PLoS One.* 6 e 24263. doi: 10.1371/journal.pone.0024263.
- Zhang, Y., Zhang, P., Shen, X., Tian, S., Wu, Y., Zhu, Y., Jia, J., Wu, J., Hu, H., 2013. Early exercise protects the blood–brain barrier from ischemic brain injury via the regulation of MMP-9 and occludin in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11096–11111.

Zhong, T., Ren, F., Huang, C.S., Zou, W.Y., Yang, Y., Pan, Y.D., Sun, B., Wang, E., Guo, Q.L., 2016. Swimming exercise ameliorates neurocognitive impairment induced by neonatal exposure to isoflurane and enhances hippocampal histone acetylation in mice. *Neuroscience*. 316, 378–388.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais 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, 14 de agosto de 2012.

Ofício nº 468/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes**
Departamento de Nutrição – CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017295/2012-17

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Nutrição, natação e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos eletrofisiológicos sobre a potenciação associada a depressão alastrante”**.

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

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos; Idade: 90-120 dias; Peso: 300-350 gramas; Número de animais previsto no protocolo: 60

Atenciosamente,


Maria Teresa Janem
Presidente do CEEA



ANEXO B – Comprovação da submissão do artigo 1

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

From: **Neuroscience Letters** <nsf@elsevier.com>
Date: 2016-01-28 21:27 GMT-02:00
Subject: Neuroscience Letters Submission Confirmation
To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Re: Early swimming exercise differentially modulates electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats previously suckled in different litter sizes

by Mariana B Silva-Gondim, PhD; Thays Kallyne M Souza, PhD; Marcelo Cairrão A Rodrigues, PhD; Rubem C.A. Guedes, M.D., Ph.D.

Research paper

Dear Prof. Guedes,

Your submission entitled "Early swimming exercise differentially modulates electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats previously suckled in different litter sizes" has been received for consideration in Neuroscience Letters.

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/nsf/>

Your username is: guedes.rca@gmail.com

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

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

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

Kind regards,

Neuroscience Letters
Email: nsf@elsevier.com

ANEXO C – Comprovação da submissão do artigo 2

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

From: **Brain Research** <bres@elsevier.com>
Date: 2016-02-06 23:05 GMT-02:00
Subject: Submission Confirmation
To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Dear Dr. Guedes:

Your submission, Swimming exercise in adult rats that were previously suckled under different litter sizes: effects on the electrocorticogram potentiation after spreading depression., article type Research Report, for Brain Research has been received by the Editorial Office and will be processed as soon as possible.

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

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

Your username is: guedes.rca@gmail.com

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

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

Kind regards,

The Brain Research Editorial Office