

Elian da Silva Francisco

**INTERAÇÃO TAURINA-PILOCARPINA NO CÉREBRO DESNUTRIDO: uma
análise comportamental, eletrofisiológica e imunohistoquímica**

Recife

2019

Elian da Silva Francisco

INTERAÇÃO TAURINA-PILOCARPINA NO CÉREBRO DESNUTRIDO: uma
análise comportamental, eletrofisiológica e imunohistoquímica

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.

Área de Concentração: Bases Experimentais da Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Recife
2019

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

F819i Francisco, Elian da Silva.
Interação taurina-pilocarpina no cérebro desnutrido: uma análise comportamental, eletrofisiológica e imunohistoquímica/ Elian da Silva Francisco. – Recife: o autor, 2019.
93 f.; il.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Taurina. 2. Pilocarpina. 3. Depressão Alastrante da Atividade Elétrica Cortical. 4. Ansiedade. 5. Neuroglia. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 135)

Elían da Silva Francisco

INTERAÇÃO TAURINA-PILOCARPINA NO CÉREBRO DESNUTRIDO: uma
análise comportamental, eletrofisiológica e imunohistoquímica

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.

Aprovada em: 22 de Fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Belmira Lara da Silveira Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Carol Virgínia Góis Leandro
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Geórgia de Sousa Ferreira Soares

Prof^a Luciana Maria Silva de Seixas Maia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Cristovam Wanderley Picanço Diniz
Universidade Federal do Pará

Ao meu esposo (*Prisciliano Hernane*) e a minha filha (*Helena*), por tudo que representam em minha vida,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, que me permitiu chegar até aqui, dando-me forças para prosseguir cada vez que apareciam as dificuldades.

Ao meu esposo, *Prisciliano Hernane*, pelo amor, cuidado, paciência, compreensão, companheirismo e todo incentivo desde que começamos a dar nossos primeiros passos no relacionamento a dois. Agradeço sempre a Deus por sua presença essencial em minha vida.

A minha filha, *Helena Silva*, que chegou em minha vida em momento único trazendo consigo ainda mais alegria e cor aos meus dias; uma experiência única que tem transformado minha forma de observar e interagir com o mundo a cada dia.

Aos meus, pais *Laudecy* e *Mariano*, por todo amor, carinho, dedicação, ensinamentos, paciência, força e apoio prestado em cada fase da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus irmãos *Elizeu*, *Elisan*, *Eliatan* e *Elisafan (in memoriam)*, por tudo o que representam em minha vida.

A família do meu esposo, que agora também é minha, por todo o apoio, compreensão e carinho.

Aos meus *familiares e amigos*, pela amizade e compreensão em todas as minhas ausências para que eu pudesse concluir essa etapa.

Ao meu orientador Prof^o Dr *Rubem Guedes*, minha sincera admiração e gratidão por sua inteira dedicação à Pesquisa e ao Ensino. Agradeço pela excelente orientação durante o desenvolvimento desta tese. Obrigada por me receber no LAFINNT em 2002, nunca esquecerei aquele dia. Desde lá, sempre com muita atenção e zelo no ensino, participando ativamente da construção do meu pensamento científico que agora começa a dar seus primeiros passos. Muito obrigada!!!

A Prof^a *Ana Paula*, por orientar os meus primeiros passos na iniciação científica.

A *Rosângela, Cássia e Geórgia*, pela grande contribuição nos procedimentos experimentais e pelo cuidado em repassar seus conhecimentos. Foram muitos obstáculos e angústias superadas diante dos experimentos, mas com a ajuda de vocês foram superados. Obrigada pela amizade construída ao longo desse tempo.

Aos estagiários, *Catarina Guedes, Catarina Nicácio e Arthur*, os quais acompanhei mais de perto ensinando tudo que aprendi não só no LAFINNT mas durante a vida. Parabênzico por construírem escadas e não obstáculos diante dos desafios. Desejo muito sucesso!

A todos do LAFINNT, *Rosângela, Mariana, Thays, Denise, Cássia, Nora, Andréia, Regina, Paula, Suênia, Larissa, Geórgia, Joselma, Kelly* e Prof^o *Ricardo* e aos que passaram pelo laboratório durante esse período, pelo companheirismo, apoio tecnológico e intelectual, incentivo e amizade, sem os quais essa caminhada não teria o mesmo significado. A minha perseverança e confiança veio de cada um de vocês.

Ao *Programa de PG em Nutrição* e aos *órgãos de fomento* (FACEPE, CNPq, CAPES).

Ao veterinário *Edeones França*, pela colaboração no fornecimento e no manuseio dos animais, por toda atenção e ensinamentos desde 2002 e carinho recebido.

A *todos*, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Taurina, um aminoácido inibitório, têm se mostrado importante por atenuar sintomas das epilepsias. Em ratos, a epilepsia produzida por pilocarpina reproduz a epilepsia humana do lobo temporal. Esta tese investigou a interação taurina-pilocarpina sobre ganho de peso, glicemia, ansiedade, eletrofisiologia cerebral (depressão alastrante cortical – DAC), estresse oxidativo e atividade glial. Adicionalmente, testamos se a deficiência nutricional modularia os efeitos dos tratamentos. Ratos Wistar foram amamentados em condições normais ou desfavoráveis de lactação (respectivamente amamentação em ninhadas com 9 e 15 filhotes). Cada condição de lactação, originou 5 subgrupos, tratados entre o 35º ao 55º dia de vida pós-natal (P) com 1) taurina (300 mg/Kg/dia) + pilocarpina (45 mg/Kg/dia); 2) apenas taurina; 3) apenas pilocarpina; 4) veículo (salina); 5) Ingênuo, sem tratamento. Em PND56 e PND58, foram testados comportamentalmente no labirinto em cruz elevado e no aparelho de campo aberto. Em PND59 aferiu-se a glicemia. Em PND60-PND65 registrou-se a DAC e avaliou-se os níveis de liporeoxidação cerebrais. O padrão de imuno-marcação microglial e astrocitária com anticorpos específicos foi avaliado no córtex e hipocampo. Nossos dados indicam que a taurina e/ou pilocarpina influenciam os parâmetros estudados; a lactação desfavorável modula esses efeitos. A administração de taurina não atenuou os efeitos provocados pela pilocarpina. Investigações futuras são necessárias para aprofundar a relevância desse aminoácido no tratatamento das epilepsias.

Palavras-chave: Taurina. Pilocarpina. Depressão Alastrante da Atividade Elética Cortical. Ansiedade. Neuroglia. Desnutrição.

ABSTRACT

Taurine, an inhibitory amino acid, has been shown to attenuate symptoms of epilepsy. In rats, epilepsy produced by pilocarpine reproduces human temporal lobe epilepsy. This thesis investigated the interaction of taurine-pilocarpine on weight gain, glycemia, anxiety, cerebral electrophysiology (cortical spreading depression-CSD), oxidative stress and glial activity. Additionally, we tested whether nutritional deficiency modulated the effects of treatments. Wistar rats were breastfed under normal or unfavorable conditions of lactation (respectively breastfeeding in litters with 9 and 15 pups). Each lactation condition resulted in 5 subgroups, treated between the 35th and 55th day postnatal life (PND) with 1) taurine (300 mg / kg / day) + pilocarpine (45 mg / kg / day); 2) only taurine; 3) only pilocarpine; 4) vehicle (saline); 5) Naive, without treatment. In PND56 and PND58, they were behaviorally tested in the elevated plus maze and open field apparatus. In PND59 the glycemia was checked. CSD was recorded in PND60-PND65 and the levels of cerebral liporeoxidation. The standard of microglial and astrocyte immunoblotting with specific antibodies was evaluated in the cortex and hippocampus. Our data indicate that taurine and / or pilocarpine influence the studied parameters; unfavorable lactation modulates these effects. Administration of taurine did not attenuate the effects of pilocarpine. Future investigations are needed to deepen the relevance of this amino acid in the treatment of epilepsy.

Keywords: Taurine. Pilocarpine. Cortical spreading depression. Anxiety. Neuroglial. Malnutrition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação entre as etapas de desenvolvimento	22
Figura 2 - Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da DAC	24
Figura 3 - Representação esquemática do primeiro desenho experimental	35
Figura 4 - Representação esquemática do segundo desenho experimental	36
Figura 5 - Representação esquemática do labirinto em cruz elevado	39
Figura 6 - Representação esquemática do campo aberto	40
Figura 7 - Esquema do registro eletrofisiológico da DAC	41
Figura 8 - Peso corporal	45
Figura 9 - Glicemia de jejum	46
Figura 10 - Comportamento no Campo aberto	47
Figura 11 - Registro eletrofisiológico e velocidade da DAC	49
Figura 12 - Peso corporal, encefálico, cortical e hipocampal	51
Figura 13 - Comportamento no labirinto em cruz elevado	53
Figura 14 - Glicemia de jejum	54
Figura 15 - Velocidade da DAC	56
Figura 16 - Registro eletrofisiológico do ECoG e DAC	58
Figura 17 - Níveis de MDA	61
Figura 18 - Fotomicrografias do córtex e hipocampo imunomarcadas – Iba1	62
Figura 19 - % de área e imunorreatividade córtex e hipocampo – Iba1	63
Figura 20 - Fotomicrografias do córtex e hipocampo imunomarcadas – GFAP	65
Figura 21 - % de área e imunorreatividade do córtex e hipocampo – GFAP	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições que facilitam a propagação da DAC	26
Tabela 2 - Condições que dificultam a propagação da DAC	27
Tabela 3 - Amplitude e duração da DAC - Desenho experimental I	50
Tabela 4 - Amplitude e duração da DAC - Desenho experimental II	57
Tabela 5 - Potenciação da amplitude do ECoG induzida pela DAC	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CA	Open field/Campo aberto
CNS	Central nervous system
CSD	Cortical spreading depression
DAC	Depressão alastrante cortical
ECoG	Eletrocorticograma
E1	Ponto 1 de registro do ECoG
E2	Ponto 2 de registro do ECoG
ELT	/Epilepsia do lobo temporal
GABA	γ -aminobutyric acid/ácido γ -aminobutírico
i.p.	Intraperitoneal
L ₁₅	Unfavorable lactation/Lactação desfavorável
L ₉	Normal lactation/Lactação normal
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
LCE	Elevated plus maze/ Labirinto em cruz elevado
MDA	Malondialdehyde/Malondialdeído
Nv	Naïve/Ingênuo
P	Pilocarpine/Pilocarpina
T+P	Taurine+pilocarpine/Taurina+pilocarpina
PND	Post natal day/Dia de vida pós-natal
SE	status epilepticus
SNC	Sistema nervoso central
T	Taurine/Taurina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
V	Vehicle/Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO	15
2.2	EPILEPSIA	17
2.2.1	Pilocarpina e sistema nervoso	20
2.3	TAURINA E SISTEMA NERVOSO	21
2.4	DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	23
2.4.1	Depressão alastrante cortical e potenciação do ECoG	29
3	HIPÓTESE	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	METODOLOGIA	34
5.1	ANIMAIS	34
5.1.1	Grupos experimentais	35
5.2	ADMINISTRAÇÃO DE PILOCARPINA E TAURINA	36
5.3	DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL, ENCEFÁLICO, CORTICAL E HIPOCAMPAL	37
5.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	38
5.4.1	Labirinto em cruz elevado	38
5.4.2	Campo aberto	39
5.5	ANÁLISE DE GLICOSE NO SANGUE	40
5.6	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA DAC	40
5.7	ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	42
5.8	IMUNOHISTOQUÍMICA	42
5.8.1	Análise imunohistoquímica para micróglia	43
5.8.2	Análise imunohistoquímica para astrócito	44
5.8.3	Análise densitométrica	44
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6	RESULTADOS	45
6.1	RESULTADOS DO 1º DESENHO EXPERIMENTAL	45

6.1.1	Peso corporal	45
6.1.2	Glicemia de jejum	46
6.1.3	Atividade comportamental no campo aberto	46
6.1.4	Parâmetros da depressão alastrante cortical	48
6.2	RESULTADOS DO 2º DESENHO EXPERIMENTAL	50
6.2.1	Peso corporal e encefálico	50
6.2.2	Atividade comportamental no labirinto em cruz elevado	52
6.2.3	Glicemia de jejum	54
6.2.4	Parâmetros relacionados à DAC	55
6.2.4.1	Velocidade de propagação da DAC	55
6.2.4.2	Amplitude e duração da DAC	56
6.2.4.3	Potenciação da amplitude do ECoG induzida pela DAC	58
6.2.5	Níveis de malondialdeído no córtex e hipocampo	60
6.2.6	Imunohistoquímica para micróglia e astrócito	61
6.2.6.1	Imunohistoquímica para Iba-1	61
6.2.6.2	Imunohistoquímica para GFAP	65
7	DISCUSSÃO	68
8	CONCLUSÃO	73
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
9.1	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXO - A CONFIRMAÇÃO DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	91
	ANEXO - B CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2	92
	ANEXO - C PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	93

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição e a epilepsia são importantes problemas de saúde pública em diversos países em desenvolvimento, com implicações econômicas e socioculturais. Acredita-se que as alterações provocadas por ambas, quando em associação, podem potencializar os efeitos deletérios que incidem sobre o SNC (PORTO et al., 2010). Sendo ambas condições prevalentes em nosso meio, faz-se necessário uma maior exploração dessas condições e de suas consequências a nível comportamental, eletrofisiológico, bioquímico e celular.

Clinicamente, a taurina, um aminoácido condicionalmente essencial, tem sido utilizado com vários graus de sucesso no tratamento de uma ampla variedade de condições, como doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, fibrose cística, degeneração macular, doença de Alzheimer, distúrbios hepáticos, alcoolismo, epilepsia e outros distúrbios convulsivos (BIRDSALL, 1998). Entretanto, os mecanismos celulares, bioquímicos e eletrofisiológicos envolvidos nas ações da taurina na epilepsia não são totalmente conhecidos. (RIPSS; SHEN, 2012; OJA; SARANSAARI, 2013; WINKLER; LUHMANN; KILB, 2018).

Os efeitos neurais provocados por alterações nutricionais podem ser observados através do estudo da atividade elétrica cerebral, utilizando-se como modelo experimental o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC). A DAC tem sido associada a distúrbios de excitabilidade cerebral e suas doenças, como as epilepsias (FRANCISCO; GUEDES, 2015). Isso tem motivado o Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde CCS/UFPE a estudar os efeitos de variáveis nutricionais e não-nutricionais e suas interações sobre o sistema nervoso central (SNC), bem como suas repercussões sobre a atividade elétrica cerebral. Esses estudos têm avaliado alterações do fenômeno da DAC, bem como de parâmetros bioquímicos, comportamentais e imunohistoquímicos (GUEDES, 2011; LIMA et al., 2017).

A importância do tema para a saúde humana justifica a sua investigação no presente trabalho. Os modelos animais desempenham um papel crucial e importante para maior entendimento da ação do estado nutricional associado à epilepsia, bem como do papel modulador da taurina. Este projeto se propôs a esclarecer aspectos comportamentais, eletrofisiológicos, bioquímicos e imunohistoquímicos, envolvidos tanto na gênese quanto na progressão da epilepsia. Entender como funciona o SNC,

sob tais condições, poderia ajudar a minimizar as repercussões negativas tanto para o indivíduo, como para a sociedade. Os resultados da presente investigação estão contidos em dois artigos originais, dos quais um encontra-se publicado na revista “Frontiers in Neuroscience” intitulado ***Sub-convulsing dose administration of pilocarpine reduces glycemia, increases anxiety-like behavior and decelerates cortical spreading depression in rats suckled on various litter sizes***, e o Segundo, submetido à revista “Frontiers in Neuroscience” intitulado **Taurine/pilocarpine interaction in the malnourished brain: a behavioral, electrophysiological and immunohistochemical analysis.**

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO

Apesar dos índices crescentes de obesidade em todo o mundo, a desnutrição, principalmente na infância, continua a ser um grave problema de saúde enfrentado por países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do país (ONIS et al., 1993; BATISTA-FILHO; RISSIN, 2003; OLIVEIRA et al., 2006). A desnutrição, no período perinatal, pode modificar negativamente parâmetros estruturais, bioquímicos, comportamentais e eletrofisiológicos do cérebro, e alguns desses efeitos podem durar eventualmente até a vida adulta (MORGANE et al., 1978; FRAZÃO; MAIA; GUEDES, 2008; GUEDES, 2011).

Uma nutrição adequada está relacionada com a prevenção de doenças crônicas e manutenção de uma boa qualidade de vida do indivíduo. Muitos problemas de saúde pública possuem relação com o estado nutricional (BENTON et al., 2008). Com relação ao sistema nervoso, uma assimilação adequada de nutrientes, particularmente no início da vida, é um dos principais fatores não genéticos capazes de influenciar positivamente o cérebro em desenvolvimento (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

No início da vida, o sistema nervoso tem seu crescimento e desenvolvimento acontecendo intensamente. Processos como a hiperplasia (aumento da quantidade de células nervosas), a hipertrofia (aumento do seu tamanho), a mielinização (formação de uma bainha de mielina nas fibras nervosas) e a organização das sinapses são fundamentais para o desenvolvimento neural. A mielinização e uma boa rede de pontos de comunicação entre os neurônios (organização sináptica) são essenciais para a transmissão eficiente das informações contidas nos impulsos elétricos neuronais (MORGANE et al., 1978; 1993).

Esses processos encontram-se intensificados no chamado “período crítico de desenvolvimento” ou “período de crescimento rápido do cérebro”. No homem, essa fase de maior vulnerabilidade inicia-se no terceiro mês gestacional e segue até os primeiros dois a quatro anos de vida. No rato (o modelo animal mais utilizado para esses estudos), esse período equivale às três primeiras semanas de vida pós-natal, coincidindo com o período de aleitamento (Figura 2; MORGANE et al., 1993; SCRIMSHAW; GORDON, 1968). O impacto neural do insulto nutricional pode ser mais

ou menos severo, a depender da etapa do desenvolvimento em que ele incide, bem como da sua intensidade e duração (GUEDES, 2011).

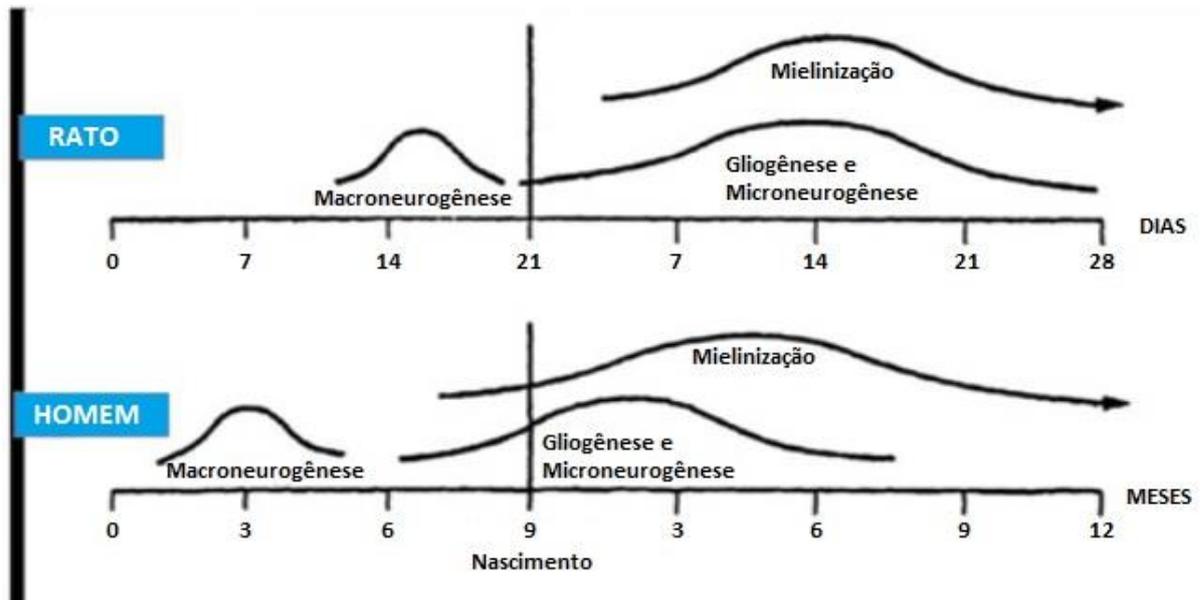


Figura 1. Comparação entre as etapas de desenvolvimento do sistema nervoso no homem e no rato, incluindo as fases pré e pós-natal. Adaptada de Morgane et al., 1993.

A inadequação nutricional continua a ser um dos principais fatores não genéticos que afetam o cérebro em desenvolvimento (ALAMY; BENGELLOUN, 2012). O termo desnutrição implica em que um ou mais nutrientes estão ausentes ou em proporções erradas. Diferentemente, mas também prejudicial, na subnutrição todos os elementos requeridos estariam disponíveis na dieta, mas alguns em quantidades insuficientes (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). A subnutrição, pode ser induzida experimentalmente através do emprego de alguns modelos experimentais, tais como: grande número de filhotes por ninhada; restrição dos filhotes à presença materna; ou redução na quantidade de dieta ofertada (ALAMY; BENGELLOUN, 2012).

Os astrócitos e as células microgliais têm a capacidade de reagir em resposta às demandas do SNC (Crunelli et al., 2014). Elas são as células imunes residentes do SNC e continuamente pesquisam o microambiente com seus processos altamente dinâmicos, podendo ser ativadas em resposta às necessidades teciduais associadas a condições deletérias, tais como aquelas envolvidas nas respostas inflamatórias e comportamentais do cérebro (Viana et al. 2013).

Um modelo utilizado para induzir alterações nutricionais em ratos consiste no aumento do tamanho da ninhada. Em ninhadas formadas por grande quantidade de filhotes ocorre uma competição pelo leite materno, resultando em desnutrição moderada a grave (HERNANDES et al., 2005; ROCHA-DE-MELO et al., 2006; MAIA et al., 2009; LIMA et al., 2009; 2017). Esta pode influenciar o desenvolvimento do SN, alterando-o do ponto de vista eletrofisiológico, o que pode ser estudado por meio do fenômeno da depressão alastrante cortical (BATISTA DE OLIVEIRA et al., 2012; FRANCISCO; GUEDES, 2015; LIMA et al., 2017). A DAC (ver sua descrição mais abaixo) tem sido associada a distúrbios da excitabilidade cerebral e suas doenças, como a epilepsia.

Estudos têm demonstrado uma forte relação entre o desenvolvimento de epilepsia e a desnutrição (NUNES et al, 1999; HACKETT; IYPE, 2001; CABRAL et al., 2011). Cabral e colaboradores (2011) mostraram que animais desnutridos exigem uma dose menor de pilocarpina para desenvolver SE (200 mg / kg), menor latência para estabelecimento do SE, menor tempo para a primeira convulsão espontânea e maior frequência de convulsão, quando comparado com ratos nutridos. Os achados histopatológicos revelaram uma redução significativa da densidade celular na região CA1 e intenso brotamento de fibras musgosas entre os animais desnutridos.

2.2 EPILEPSIA

A epilepsia é um dos transtornos neurológicos mais prevalentes em todo o mundo. Afeta aproximadamente 50 milhões de indivíduos de todas as idades, com maior prevalência nas primeiras décadas de vida. A incidência de crises epiléticas é maior na adolescência, quando comparada com a que ocorre na vida adulta, sendo que a maioria das epilepsias surge durante as fases iniciais do desenvolvimento humano (TAMBER; MOUNTZ, 2012). Cerca de 80% dos indivíduos afetados residem em países de baixa e média renda. A incidência e prevalência de epilepsia em populações de baixa renda é maior do que no resto do mundo (ESPINOSA-JOVEL et al., 2018), e mais de 75% dessa população acham-se desprovidos de qualquer tratamento (LEONARDI; USTUN, 2002; ESPINOSA-JOVEL et al., 2018).

Clinicamente, a epilepsia é caracterizada por manifestações recorrentes e espontâneas, provocadas por descargas neuronais anormais, sincronizadas e de alta frequência, chamadas crises epiléticas. (FISHER et al., 2005; BAULAC e PITKÄNEN,

2009; O'DELL et al., 2012). A *International League Against Epilepsy* (ILAE) definiu crise epiléptica como a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido a atividade neuronal excessiva ou síncrona no cérebro (FISHER et al., 2005).

A epilepsia pode ser consequência da manifestação de distúrbios cerebrais com implicações desastrosas para a qualidade de vida dos pacientes, limitando significativamente sua vida independente, educação e emprego, a mobilidade e as relações pessoais (VAN LIEFFERINGE et al., 2013). Conforme a apresentação clínica da crise epiléptica infere-se a participação, nela, de grupos neuronais localizados (crises epilépticas parciais) ou uma alteração difusa do controle elétrico cerebral, que gera crises generalizadas, que podem ser acompanhadas por perda de consciência (MEYER et al., 2010). Em algumas situações, crises parciais iniciadas focalmente propagam-se rapidamente, gerando crises secundariamente generalizadas (HOLMES; ZHAO, 2008). As desordens epilépticas parciais representam 60% dos casos, sendo a epilepsia do lobo temporal (ELT) a manifestação mais comum em humanos (ENGLLOT; CHANG, 2014). Apesar da grande quantidade de drogas antiepilépticas, que suprimem ou previnem as crises, cerca de 30-40% dos pacientes, crianças e adultos, apresentam-se resistentes ao tratamento medicamentoso (BAULAC; PITKANEN, 2008).

O diagnóstico de epilepsia deve atender no mínimo uma das seguintes condições: 1) ao menos duas convulsões não provocadas (ou reflexas) dentro de 24h; 2) uma convulsão não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de futuras convulsões semelhantes ao risco de recorrência geral após duas convulsões não provocadas, ocorrendo dentro de 10 anos; 3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014). Quando as convulsões ocorrem em sequência, uma após outra, e a pessoa não se recupera entre as convulsões, caracteriza-se o *status epilepticus* (SE), que envolve dois estágios: crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas e descargas elétricas contínuas (LÉVESQUE; AVOLI; BERNARD, 2016). A instauração do SE está relacionado com alta taxa de mortalidade, sendo considerado um importante problema de saúde pública (FISHER et al., 2014).

A epileptogênese possui forte relação com um possível desequilíbrio entre os mecanismos de excitação (glutamatérgicos) e inibição neuronal (GABAérgicos), no sentido do favorecimento das forças excitatórias (MORIOMOTO; FAHNESTOCK; RACINE, 2004; L'AMOREAUX; MARSILLO; EL IDRISSE, 2010). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro humano (MINJAREZ et al,

2017). A ação do glutamato, em condições normais, se dá por meio dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos e a recaptação do glutamato sináptico é realizada pelos astrócitos através dos transportadores de glutamato GLT-1 e GLAST. As convulsões crônicas podem promover alterações na expressão neuronal e glial de receptores de glutamato e de transportadores de sua captação. Tais alterações contribuem para elevações no glutamato extracelular, induzindo danos excitotóxicos, colaborando assim na manutenção e propagação de crises epilépticas (BARKER-HALISKI; WHITE, 2015).

Na ELT, as convulsões são iniciadas no hipocampo ou no córtex entorrinal devido a uma falha no controle colinérgico e/ou GABAérgico (PLATT; RIEDEL, 2011). O sistema colinérgico tem a acetilcolina como principal neurotransmissor excitatório. A ativação desse sistema no cérebro é realizada pela ativação de dois tipos de receptores: nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos são receptores ionotrópicos (subunidades α e β), enquanto que os receptores muscarínicos (subtipos M1 a M5) são receptores metabotrópicos ligados à proteína G (MELANCON et al., 2013). Em uma grande variedade de neurônios, a ativação de receptores muscarínicos colinérgicos induz a hiperexcitabilidade. O subtipo M1 é o mais abundante dos receptores muscarínicos no SNC, altamente expresso no córtex, hipocampo, estriado e tálamo (LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008). Este subtipo tem sido sugerido como sendo o principal envolvido nas atividades convulsivas (HAMILTON et al., 1997; BYMASTER et al., 2003) e em processos de aprendizado e memória (BERKELEY et al., 2001; MELANCON et al., 2013).

O GABA (sigla em inglês de 'Gama-Amino-Butiric Acid') é amplamente distribuído e utilizado em todo o sistema nervoso central (SNC) e mantém um papel inibitório que contrabalança a excitação neuronal (MINJAREZ et al., 2017). Por seu papel, o sistema GABAérgico têm sido exaustivamente estudado, pois a redução de sua atividade desempenha um papel crucial em fenômenos epilépticos. O GABA é reconhecido como o principal neurotransmissor inibitório no cérebro adulto, responsável pela geração dos potenciais inibidores pré-sinápticos por hiperpolarização de neurônios (YIN; AHMAD; MAK MOR-BAKRY, et al., 2013). Deste modo, substâncias ou fármacos capazes de influenciar esse sistema podem desempenhar um importante papel no esclarecimento dos possíveis mecanismos e auxiliar no controle das epilepsias. Esse é o caso da pilocarpina e da taurina, como veremos a seguir.

2.2.1 Pilocarpina e sistema nervoso

A pilocarpina é um alcaloide natural extraído das folhas da planta jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) com ação colinérgica direta sobre os receptores neurais muscarínicos e musculatura lisa da íris e glândulas de secreção. Na clínica, é indicada como terceira linha de tratamento no controle do glaucoma (pressão intraocular elevada), com eficácia comprovada (LEE; HIGGINBOTHAM, 2005; PETSAS; CHAPMAN; STEWART, 2017) e no tratamento dos sintomas da boca seca e outras condições xerostômicas (GIL-MONTOYA et al., 2016), como na síndrome de Sjögren (SHIH et al., 2017; WATANABE et al., 2018).

Além de seu relevante papel benéfico na prática clínica, a pilocarpina é fortemente reconhecida e utilizada experimentalmente como modelo químico para indução de epilepsia em roedores (SANTOS et al., 2000). A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico capaz de induzir o *status epilepticus* (SE) com apenas uma única dose, 300 a 380 mg/Kg (TURSKI et al., 1989; SANTOS et al., 2000). A pilocarpina é geralmente injetada por via i.p. Esse tratamento pode ser associado a um pré-tratamento com lítio, de modo a diminuir o limiar para a indução das convulsões (EYO, MURUGAN e WU, 2017). A pilocarpina também provoca convulsões se injetada diretamente em estruturas intra-cerebrais.

A administração intracerebral ou sistêmica da pilocarpina reproduz de forma satisfatória as manifestações histológicas, bioquímicas, comportamentais e eletrofisiológicas encontradas em humanos portadores de ELT (TURSKI et al., 1989; LÉVESQUE; AVOLI; BERNARD, 2016). Entretanto, concentrações abaixo de 190 mg/Kg não provocam alterações comportamentais ou eletrocorticográficas indicativas de convulsões (GUEDES; VASCONCELOS, 2008; MENDES-DA-SILVA et al., 2018).

A capacidade da pilocarpina promover SE se mostra relacionada à ativação de receptores muscarínicos. O subtipo M1 tem sido relacionado como principal envolvido nas crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Estudos demonstraram que camundongos geneticamente modificados, desprovidos do receptor M1, não apresentaram crises clônico-tônicas comparados a outros que possuem os outros quatro subtipos (HAMILTON et al., 1997; BY MASTER et al., 2003).

Alguns estudos têm demonstrado que o SE induzido pela pilocarpina pode ser bloqueado ou atenuado. A atropina, um antagonista muscarínico, é capaz de bloquear o SE quando a sua administração sistêmica antecede o início das crises convulsivas

(MINJAREZ et al., 2017). O treinamento físico de resistência foi identificado como particularmente eficaz na redução de convulsões comportamentais. Por sua vez, o treinamento físico forçado, tem se mostrado uma intervenção eficaz na redução das convulsões comportamentais e na melhoria de parâmetros morfológicos e químicos do cérebro em convulsões induzidas por pilocarpina (IQBAL et al., 2017). Por outro lado, outras pesquisas têm demonstrado o possível papel da taurina, importante aminoácido inibitório, auxiliando no tratamento da epilepsia e outros distúrbios convulsivos (BIRDSALL, 1998; RIPSS; SHEN, 2012; OJA; SARANSAARI, 2013).

2.3 TAURINA E SISTEMA NERVOSO

A taurina, ácido 2-aminoetano sulfônico, foi descoberta em 1827, isolado na bile de bovinos (*Bos Taurus*), de onde originou seu nome (HUXTABLE, 1992). É um composto aminado não observado como constituinte proteico, mas antes se encontra na forma livre ou de simples peptídeos (BIRDSALL, 1998). Em muitos animais, incluindo os mamíferos, é um dos mais abundantes constituintes orgânicos de baixo peso molecular (STAPLETON et al., 1998). É encontrada livremente no líquido intracelular de tecidos eletricamente excitáveis, como o cérebro, e estruturas secretoras. É um dos aminoácidos livres mais abundantes no musculo esquelético, coração, medula espinhal, leucócitos, retina e cérebro (HUXTABLE, 1992; RIPPS; SHEN, 2012).

Estudos em roedores têm demonstrado associação entre a suplementação de taurina e aumento de seus níveis neurais, bem como consequentes alterações nas concentrações de outros aminoácidos e neurotransmissores. Murakami e Furuse (2010) após administração crônica de taurina, em animais adultos, encontraram concentrações aumentadas desse aminoácido e L-arginina no hipotálamo. A aplicação intraperitoneal (i.p.) de taurina (0,25, 0,5 e 1 g/kg) conduziu a aumentos graduais nas concentrações desse aminoácido no hipocampo e corpo estriado, bem como, alterações nas concentrações de glutamato, glutamina, alanina e GABA em ambas as regiões do cérebro (MOLCHANOVA; OJA; SARANSAARI, 2007). Além disso, sua administração alterou as concentrações de noradrenalina e dopamina no hipotálamo (PANULA-LEHTO; MÄKIEN; AHTEE, 1992) e de dopamina no núcleo accumbens (ERICSON et al., 2006).

A taurina está envolvida em diversos processos fisiológicos, participando na conjugação de ácidos biliares, osmorregulação e modulação dos níveis de cálcio intracelular (RIPPS; SHEN, 2012). Administrada com finalidade terapêutica, a taurina possui uma série de propriedades citoprotetoras através de sua ação como molécula antioxidante (GREEN et al., 1995), antidiabética (TRACHTMAN et al., 1995), antihipertensiva (DAWSON et al., 2001; ROYSOMMUTI; WYSS, 2014), hepatoprotetora (DOGRU-ABBASOGLU et al., 2001) e neuroprotetora na injúria cerebral (TARANUKHIN et al., 2009). Além disso, parece prevenir apoptose em isquemia induzida (TARANUKHIN et al., 2008) e suavizar os sintomas da epilepsia (OJA; SARANSAARI, 2013).

A ação da taurina como um regulador da excitabilidade e da atividade neuronal tem sido demonstrada tanto por estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Estudo *in vitro* realizado por Jia et al (2008) demonstrou a capacidade da taurina em reduzir a excitabilidade em neurônios de retransmissão talamocorticais e ativar receptores extrasinápticos gabaérgicos e glicinérgicos em neurônios ventrobasais no tálamo de camundongos. Adicionalmente, estudo *in vivo*, descreveu um papel fisiológico importante no controle da função do núcleo accumbens pela taurina durante o desenvolvimento do SNC. (JIANG et al., 2004).

Em animais de laboratório, tem-se atribuído à taurina um papel de neuroproteção contra o acidente vascular cerebral experimental (SUN et al., 2012), hipóxia, neurotoxicidade induzida por glutamato, e inflamação (EL IDRISSEI, 2008; PAN et al., 2010). Estudos demonstraram a liberação de taurina no tecido nervoso em diversas condições de dano celular, sendo também observada sua liberação durante o fenômeno da DAC desencadeado pela aplicação de K⁺, aplicação de NMDA (N-metil D-Aspartato) ou indução de infarto trombótico (SHCELLER, 2000).

A taurina é um análogo estrutural do transmissor inibitório GABA. Em várias áreas do SNC, ela está presente em alta quantidade, sendo reconhecida como um dos mais importantes aminoácidos inibitórios distribuídos neste tecido (BARBEAU et al., 1975; YAKIMOVA, 1996; RIPPS; SHEN, 2012). A diminuição na concentração cerebral de taurina pode aumentar a excitabilidade geral de populações neuronais e, assim, contribuir para o início de convulsões (OJA; SARANSAARI, 2013). A taurina é um grande agente inibidor no cérebro, causando hiperpolarização e inibição de disparo de neurônios (OJA; SARANSAARI, 2008). Na epilepsia, a taurina, têm se mostrado importante no estabelecimento do equilíbrio entre os processos inibitórios e

excitatório no cérebro, ao atenuar sintomas em algumas populações de pacientes epiléticos (OJA; SARANSAARI, 2013). No entanto, até a presente tese nenhum estudo havia sido publicado sobre excitabilidade neural envolvendo taurina e sua interação com pilocarpina sobre o fenômeno da DAC.

2.4 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A DAC é um fenômeno eletrofisiológico que está relacionado com a excitabilidade do cérebro. Foi descrita pela primeira vez pelo neurocientista brasileiro Aristides Leão em 1944, quando realizava estudos sobre “epilepsia experimental” na superfície do córtex cerebral de coelhos anestesiados. Inicialmente, Leão constatou que estímulos elétricos, químicos ou mecânicos locais (aplicados em um ponto do córtex) são capazes de provocar uma resposta caracterizada por acentuada redução (depressão) da atividade elétrica espontânea do ponto cortical estimulado. Essa diminuição da atividade elétrica dura alguns minutos e se propaga (alastra) lentamente (velocidades da ordem de poucos mm/min) de forma concêntrica por todo o córtex. À medida que o fenômeno se propaga para regiões corticais cada vez mais afastadas do ponto inicialmente deprimido, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir desse ponto, também de forma concêntrica e ao final de cerca de 10 a 15 minutos todo o tecido encontra-se recuperado (LEÃO, 1944a). A Figura 3 apresenta a sequência temporal cíclica de eventos que ocorrem durante a DAC.

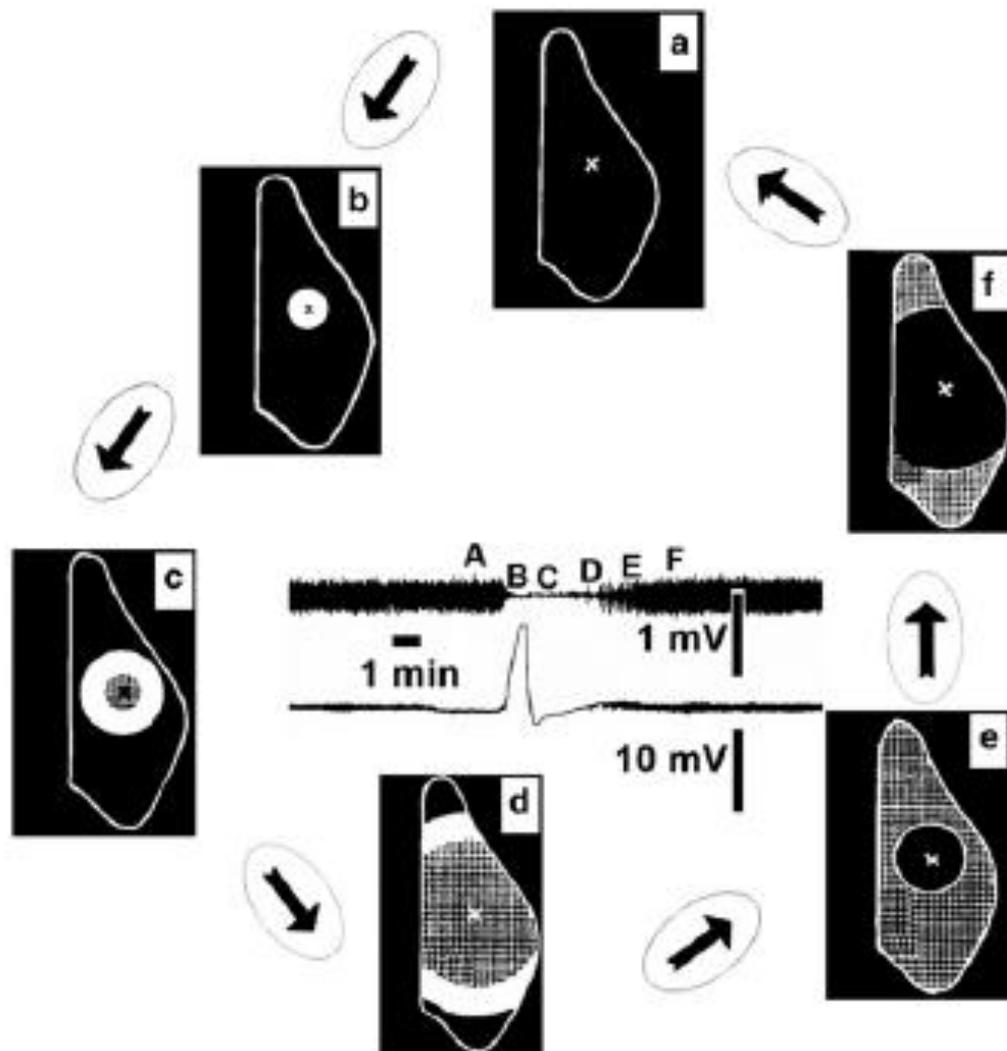


Figura 2. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC; adaptado de Guedes, 2011). Em “a”, um córtex normal e nele o ponto estimulado (x), iniciando a DAC. Na sequência, indicada pelas setas, “b” a “d”, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, “c” a “f” indicam regiões que já sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). De “b” a “f”, observa-se que propagação (área branca) e recuperação (área escura) dão-se de forma concêntrica, sendo o ponto inicialmente estimulado o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente em “a” todo o tecido se mostra completamente recuperado, retornando à condição inicial. No centro da figura, dois traçados de registro ilustram o eletrocorticograma (ECoG; traçado superior) e a variação lenta de voltagem (VLV; traçado inferior), a qual sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F” correspondem a sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

Durante a propagação da DAC, simultaneamente à diminuição da atividade elétrica cortical espontânea, é observada uma variação lenta de voltagem (VLV) na região cortical na qual o fenômeno está ocorrendo. A região cortical apresenta-se negativa em relação a um ponto de voltagem fixa. Essa variação negativa, de

amplitude entre 5 e 20mV, é comumente seguida e ocasionalmente precedida de uma fase positiva de menor amplitude (LEÃO, 1951). Subjacente a essa despolarização, várias modificações ocorrem, como: dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944b); alterações das concentrações de certos aminoácidos como taurina e glutamato em nível extracelular (SCHELLER et al., 2000; CARLSON et al, 2012); aumento na quantidade de água e alterações das concentrações de íons (efluxo celular de potássio, com influxo de cálcio, cloro e sódio); depleção de glicose e oxigênio, com aumento do lactato (HANSEN; OLSEN, 1980; ENGER et al, 2015; KRAMER et al, 2016). A restauração dos gradientes iônicos requer a utilização de glicose e ATP, através das bombas de Na/K ATPase. A depressão observada no EcoG é mantida, provavelmente devido a uma incompatibilidade entre o suprimento vascular e a demanda metabólica que ocorre durante a fase de recuperação. A capacidade do tecido para restaurar a sua homeostase metabólica depende de sua integridade e, qualquer condição que possa prejudicar essa capacidade, como hipóxia, hipoglicemia, oligoemia, pode levar a morte celular e acidente vascular cerebral (LAURITZEN et al, 2011).

Guedes (2011) resumiu as principais características dos aspectos relevantes do fenômeno da DAC, como segue: (1) é um fenômeno cooperativo, pois necessita de uma população mínima de corpos celulares para ser gerado e propagado; (2) o estímulo não precisa ser específico - requer variação brusca de energia para ser deflagrado; (3) é totalmente reversível; (4) propaga-se igualmente de uma área sensorial para uma motora e vice-versa; (5) tem sido observado em todas as espécies de vertebrados até hoje estudadas, incluindo o homem; (6) propaga-se lentamente (mm/min) em um tecido no qual o potencial de ação se propaga muito rapidamente (m/s); (7) propaga-se mais facilmente em cérebros lisencéfalicos do que em girencéfalicos; e (8) não está claro se é um fenômeno essencialmente fisiológico ou se também pode ser patológico, pois algumas evidências sugerem que os mecanismos subjacentes à DAC seriam comuns aos de certas doenças neurológicas.

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado relação entre a DAC e distúrbios na excitabilidade cerebral e suas doenças, como enxaqueca com aura (FERRARI et al., 2015; VINOGRADOVA et al., 2017), esclerose múltipla (PUSIC et al., 2015) acidente vascular cerebral isquêmico (TAMAKI et al., 2017) e epilepsia (FABRICIUS et al., 2008; WEI; ULLAH; SCHIFF, 2014; TAMAKI et al., 2017). A

presença do fenômeno foi também observada em pacientes submetidos a cirurgias neurológicas eletivas (CARLSON et al., 2016).

A DAC tem sido estudada como fenômeno potencialmente relevante para o melhor esclarecimento dos mecanismos de doenças neurológicas importantes, como as epilepsias, a enxaqueca com aura e a isquemia cerebral (PUSIC et al., 2015; VINOGRADOVA, 2017). Estudos em ratos têm demonstrado que o córtex, em algumas situações, pode tornar-se mais susceptível à DAC, propagando-a com velocidades mais altas. Em outras situações, torna-se mais resistente, apresentando velocidades de propagação mais baixas. Essa susceptibilidade ao fenômeno parece ser influenciada pelas condições em que se encontra o tecido cerebral. As tabelas 1 e 2 listam algumas das condições, disponíveis na literatura, envolvidas na alteração da excitabilidade cortical à DAC, seja facilitando (tabela 1) ou dificultando (tabela 2) a sua propagação.

Tabela 1 - Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor, Ano
Redução do cloreto extracelular	GUEDES; DO CARMO, 1980
Diazepam (1,5 – 8,0 mg/kg durante o registro)	GUEDES et al., 1992
Etanol (3 g/kg – 7, 18 ou 21 dias)	GUEDES; FRADE, 1993; ABADIE-GUEDES et al., 2008; 2012; 2016
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001
Privação do sono paradoxal	VASCONCELOS et al., 2004
Privação sensorial periférica	TENÓRIO; OLIVEIRA; GUEDES, 2009
Condição desfavorável de lactação	ROCHA-DE-MELO et al., 2006

Arginina (300 mg/kg/21 dias)	MAIA et al., 2009
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS et al., 2009
Glutamina (500 mg/kg/21 dias)	LIMA et al., 2009; LIMA et al., 2017
Dipirona (300 mg/kg/7 dias)	AMARAL et al., 2009
Ácido ascórbico (60 ou 120 mg/Kg/22 dias)	MONTE-GUEDES et al., 2011; MENDES-DA-SILVA et al., 2014; 2018
Tianeptina, (10 mg/kg/23 dias)	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013
Glutamato monossódico (2 ou 4 mg/kg/14 dias)	LIMA et al., 2013; 2014; VITOR-DE-LIMA et al., 2017
Dexametasona (doses crescentes 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg e 0,5 mg/kg por 3 dias)	LOPES-DE-MORAIS et al., 2014
Hormônios ovarianos	ACCIOLY; GUEDES, 2017

*Dieta Básica Regional

Tabela 2 - Algumas condições que dificultam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Lítio (1,5 g/kg/21 dias)	GUEDES et al., 1989
Hiperglicemia	XIMENES-DA-SILVA; GUEDES, 1991 COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006
Anestésicos	GUEDES; BARRETO, 1992
Hipotireoidismo	GUEDES; PEREIRA-DA-SILVA, 1993

Envelhecimento	GUEDES; AMORIM; TEODÓSIO, 1996
Deficiência, na dieta, de ácidos graxos essenciais	BORBA et al., 2000
Estimulação ambiental	SANTOS-MONTEIRO; TEODÓSIO; GUEDES, 2000
Fluoxetina (10, 20 ou 40 mg/kg/21 dias)	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Pilocarpina (45, 95 ou 190 mg/kg/durante o registro)	GUEDES; VASCONCELOS et al., 2008
Pilocarpina (45 mg/kg/22 dias)	MENDES-DA-SILVA et al., 2018
Epilepsia pela pilocarpina (350 mg/kg)	COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006
Triptofano (125 mg/kg/durante o registro)	TRINDADE-FILHO; VASCONCELOS; GUEDES, 2009
Abolição da função ovariana (castração) no início da vida	ACCIOLY et al., 2012
Dieta hiperlipídica	GERMANO et al., 2013
Naloxona (10 mg/kg/22 dias)	GUEDES et al., 2013
Ácido ascórbico (30 mg/kg/22 dias)	MENDES-DA-SILVA et al., 2014
Lecitina da <i>Canavalia ensiformis</i> (1 ou 10 mg/kg/20 dias)	SOARES et al., 2015
Taurina (300 mg/kg/21 dias)	FRANCISCO; GUEDES, 2015
Alanina (300 mg/kg/21 dias)	FRANCISCO; GUEDES, 2015
Etanol (1 g/kg/1 dia)	ABADIE-GUEDES et al., 2016

A desnutrição, seja por manipulação da dieta ou do tamanho da ninhada, facilitou a propagação da DAC (ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO et al., 2006; LIMA et al., 2009; GUEDES et al., 2013; MENDES-DA-SILVA et al., 2014), ao passo que doses subconvulsivantes de pilocarpina (45, 90 e 190 mg/Kg em dose única) foram capazes de antagonizar o fenômeno de forma dose-dependente (GUEDES; VASCONCELOS, 2008). Com relação ao papel de aminoácidos sobre a DAC, a suplementação, no início da vida, com os aminoácidos L-arginina (FRAZÃO; MAIA; GUEDES, 2008; MAIA et al., 2009) e L-glutamina (LIMA et al., 2009) facilita a propagação do fenômeno. Adicionalmente, o tratamento crônico com os aminoácidos triptofano (TRINDADE-FILHO; VASCONCELOS; GUEDES, 2009), taurina e alanina (FRANCISCO; GUEDES, 2015) reduziu a velocidade de propagação do fenômeno, o que pode refletir diminuição na excitabilidade do tecido cortical.

2.4.1 Depressão alastrante cortical e potenciação do eletrocorticograma

A potenciação de longa duração (LTP; sigla inglesa para a expressão “long term potentiation”) é um outro fenômeno neural. Proposto por Cajal e formulado em um modelo sináptico por Hebb (YANG; CALAKOS, 2013; NICOLL; ROCHE, 2013), é caracterizado por um aumento na magnitude das respostas pós-sinápticas, que perdura por horas, dias ou semanas, após breve estimulação repetitiva de aferentes pré-sinápticos. Ou seja, é um aumento duradouro na eficácia sináptica, plasticidade neuronal, possivelmente relacionado com os processos de aprendizagem e memória (NICOLL; ROCHE, 2013).

No hipocampo, onde foi inicialmente observada, a LTP tem sido reconhecida como modelo para estudo da plasticidade sináptica em mamíferos, uma propriedade fundamental no sistema nervoso (NICOLL; ROCHE, 2013, YANG; CALAKOS, 2013). Os estudos iniciais ocorreram no começo da década de 1970. Timothy Bliss e colaboradores na Inglaterra descobriram que poucos segundos de estimulação elétrica de alta frequência era capaz de aumentar a transmissão sináptica no hipocampo do coelho por dias ou, até mesmo, semanas. No entanto, a LTP também ocorre em outras regiões do encéfalo de forma distinta (incluindo o córtex, a amígdala e o cerebelo) em função de diferentes mecanismos de indução e expressão, apoiando

a existência de múltiplos tipos de LTP. (PURVES et al., 2005; JOHNSTONE; RAYMOND, 2011)

Diferentes moduladores agem sobre diferentes cascatas de sinalização celular e podem influenciar a magnitude final, bem como a duração da LTP. Em condições normais, esse fenômeno só ocorre quando as sinapses ativadas por estimulação aferente provocam uma despolarização suficiente para induzir um desbloqueio nos receptores glutamatérgicos, do tipo NMDA (LYNCH et al., 2007). Além disso, o aumento da eficácia sináptica observado no fenômeno da LTP é classicamente induzido por uma breve estimulação elétrica de alta frequência *in vivo* e *in vitro*, mas pode ser também induzida por uma breve exposição ao KCl – o que igualmente pode suscitar o fenômeno da DAC (GUEDES; TSURUDOME; MATSUMOTO, 2005; IZQUIERDO et al., 2008).

Evidências experimentais sugerem que a DAC pode potenciar a excitabilidade neural e atividade sináptica, com possíveis implicações para a LTP. Estudo *in vitro*, realizado em fatia de neocórtex de rato, demonstrou 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). Estudo *in vivo*, no teto óptico de rã, também demonstrou essa associação, DAC seguida de potenciação de respostas evocadas eletricamente (GUEDES; TSURUDOME; MATSUMOTO, 2005).

Corroborando esses achados, o LAFINNT tem demonstrado, através de estudo *in vivo*, que a DAC induz uma potenciação do ECoG em ratos machos, tanto sob efeito de agentes anestésicos (SOUZA et al., 2011; LOPES-DE-MORAIS et al., 2014; SILVA-GONDIM et al., 2017) como em ratos acordados, sem o efeito de anestesia (SOUZA et al., 2015). Além disso, foi evidenciado *in vitro*, em tecido cortical humano, um aumento da atividade epileptiforme associada à DAC (GORJI; SPECKMAN, 2004; DREIER et al., 2012), bem como um aumento na indução da LTP, indicando que a DAC facilita a eficácia e excitabilidade sináptica nesse tecido (BERGER et al., 2008).

Embora os modelos animais geralmente não representem a etiologia completa de uma desordem, e a grande variedade dos aspectos patológicos identificados em distúrbios humanos nem sempre se encontrem presentes, os modelos animais têm sido amplamente utilizados nas últimas décadas na pesquisa e demonstraram ser ferramentas úteis na determinação de diferentes processos moleculares e celulares (MINJAREZ et al., 2017). Diante do exposto, como inovação, esta tese se propôs a

estudar a interação taurina-pilocarpina, subconvulsivante, em ratos jovens previamente amamentados em condições normais ou desfavoráveis (denominadas respectivamente L₉ e L₁₅, conforme definidas no resumo e em metodologia). Foram avaliados os seus efeitos sobre o comportamento do tipo ansioso, a glicemia de jejum, os parâmetros relacionados à DAC, como um fenômeno eletrofisiológico influenciado por alterações da excitabilidade cerebral e os níveis de malondialdeído no córtex e hipocampo, como indicadores de estresse oxidativo. Adicionalmente, foram investigados os correlatos estruturais dessa interação, analisando-se o padrão de imunomarcção de células gliais por meio de anticorpos específicos, como descrito adiante.

3 HIPÓTESE

- A desnutrição potencializa os efeitos da administração crônica de dose subconvulsivante de pilocarpina sobre a função neural e a taurina é capaz de atenuar estes efeitos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, no rato Wistar, se os efeitos neurais provocados pelo tratamento crônico com dose subconvulsivante de pilocarpina dependem do estado nutricional precoce (condições L₉ e L₁₅), bem como se o tratamento crônico com taurina é capaz de anular ou atenuar tais alterações.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nas condições de tratamento acima descritas:

- ✓ Acompanhar a evolução do peso corporal dos filhotes, como indicador do desenvolvimento do organismo;
- ✓ Avaliar o peso cerebral, ao final do experimento, como indicador de efeitos da restrição nutricional sobre o cérebro em desenvolvimento;
- ✓ Avaliar parâmetros comportamentais de ansiedade através dos testes do labirinto em cruz elevado e do campo aberto;
- ✓ Mensurar a glicemia em jejum;
- ✓ Investigar a possível relação entre as associações da pilocarpina, taurina e estado nutricional precoce, sobre a suscetibilidade cortical ao fenômeno da DAC (velocidade de propagação, amplitude e duração);
- ✓ Quantificar a amplitude da atividade elétrica cortical antes e após a DAC e compará-las, como forma de demonstrar o efeito de potenciação do ECoG, que é dependente da DAC;
- ✓ Avaliar o estado oxidativo no córtex e hipocampo cerebral, a partir da análise de peroxidação lipídica e correlacionar os dados obtidos com os parâmetros da DAC;
- ✓ Analisar, através do estudo imunohistoquímico, padrão de imuno-marcação glial e astrocitária no córtex e hipocampo associadas aos respectivos tratamentos.

5 METODOLOGIA

Este trabalho científico foi realizado 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 descritos a seguir foram previamente submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.015655/2015-99 – ANEXO B). As normas adotadas são sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e estão em concordância com as normas estabelecidas pelo National Institute of Health (Bethesda, USA), em sua publicação “Guide for Care and Use of Laboratory Animals”.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, nascidos de matrizes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Durante gestação e aleitamento, as mães consumiram dieta padrão do biotério (PRESENCE-Purina do Brasil Ltda; com 23% de proteína) e água filtrada *ad libitum*. Os animais durante todo o procedimento experimental foram alojados em gaiolas de polipropileno (51 cm x 35,5 cm x 18,5 cm) e mantidos em sala com temperatura de 22 °C \pm 1 °C, num ciclo claro-escuro de doze horas (o período “claro” sempre iniciado às 06:00 h).

Neonatos de ambos os sexos, de mães distintas, foram reunidos e designados aleatoriamente para uma das duas condições distintas de lactação: 1) lactação normal (grupo L₉), ninhadas constituídas por 9 filhotes, e 2) lactação desfavorável (grupo L₁₅; ninhadas com 15 filhotes). É sabido que essa condição de lactação desfavorável, pelo aumento no tamanho da ninhada, promove, entre os filhotes, competição pelo leite materno, levando a uma deficiência nutricional (ROCHA-DE-MELO et al, 2006; FRANCISCO e GUEDES, 2015; LIMA et al., 2017). O desmame foi realizado sempre no 21º dia de vida pós-natal (PND), considerando o dia do nascimento como 0 (zero). Após o desmame, os filhotes foram alimentados com a dieta padrão materna.

Em todo o período do aleitamento a mortalidade dos filhotes no grupo L₁₅ foi baixa. Nos poucos casos de óbito, re completamos a ninhada com filhotes de mesma

idade para que a competição pelo leite materno persistisse até o último dia de aleitamento (PND21).

5.1.1 Grupos experimentais

O presente estudo foi constituído de dois desenhos experimentais com a finalidade de responder as duas perguntas condutoras, originando 2 artigos originais.

No primeiro desenho experimental, cada condição de lactação, originou 3 (três) subgrupos, totalizando 6 grupos conforme descrito abaixo e ilustrado na Figura 4:

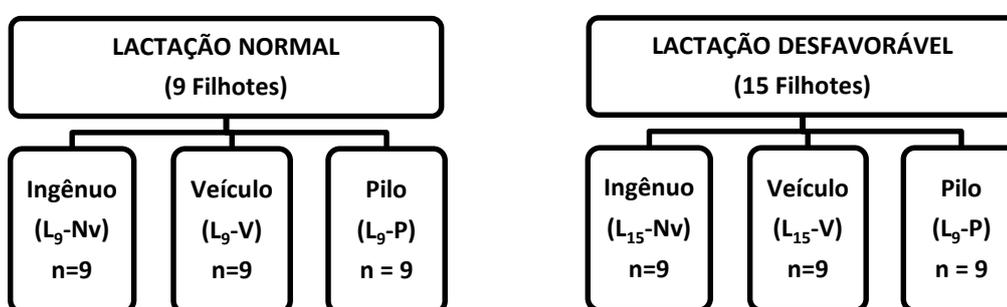


Figura 3. Representação esquemática dos 6 grupos do primeiro desenho experimental

- 1) **Ingênuo (Nv)**, sem qualquer tipo de tratamento, como controle do estresse a que os animais foram submetidos: grupos **L₉-Nv** e **L₁₅-Nv**;
- 2) **Veículo (V)**, tratados com metilnitrato de escopolamina, i.p. + salina, i.p.); controle do tratamento oferecido: grupos **L₉-V** e **L₁₅-V**;
- 3) **Pilocarpina (P)**, tratados com metilnitrato de escopolamina, i.p. + pilocarpina, i.p.: grupos **L₉-P** e **L₁₅-P**.

Na segunda fase experimental, cada condição de lactação originou 5 (cinco) subgrupos, totalizando 10 grupos conforme descrito abaixo e ilustrado na Figura 5:

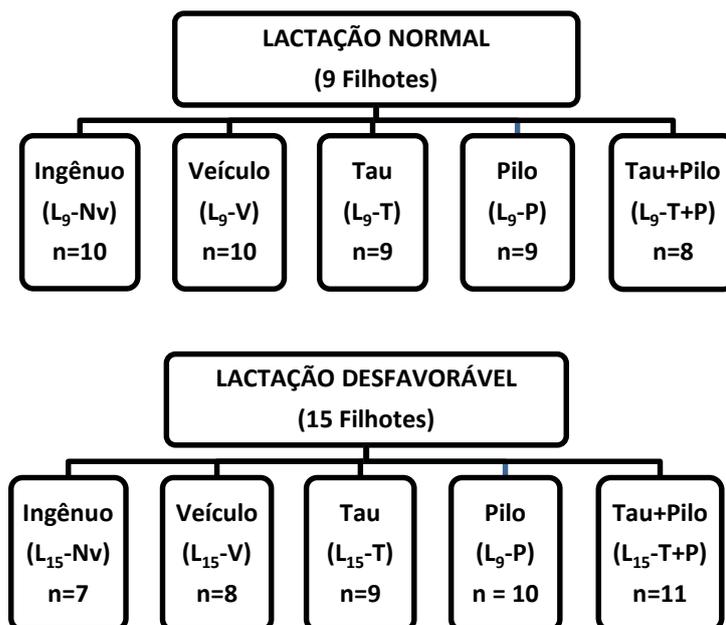


Figura 4. Representação esquemática do segundo desenho experimental

- 1) **Ingênuo (Nv)**, sem qualquer tipo de tratamento, como controle do estresse a que os animais foram submetidos: grupos **L₉-Nv** e **L₁₅-Nv**;
- 2) **Veículo (V)**, tratados com metilnitrato de escopolamina, i.p. + salina, i.p. + salina, por gavagem; controle do tratamento oferecido: grupos **L₉-V** e **L₁₅-V**;
- 3) **Taurina (T)**, tratados com metilnitrato de escopolamina, i.p. + salina, i.p. + taurina, por gavagem: grupos **L₉-T** e **L₁₅-T**;
- 4) **Pilocarpina (P)**, tratados com metilnitrato de escopolamina, i.p. + pilocarpina, i.p. + salina, por gavagem: grupos **L₉-P** e **L₁₅-P**;
- 5) **Taurina + Pilocarpina (T+P)**, tratados com metilnitrato de escopolamina, i.p. + pilocarpina, i.p. + taurina, por gavagem: grupos **L₉-T+P** e **L₁₅-T+P**.

5.2 ADMINISTRAÇÃO DE PILOCARPINA E TAURINA

Cloridrato de pilocarpina, metilnitrato de escopolamina e taurina foram adquiridos da firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A administração desses

compostos foi realizada do PND35 ao PND55, sempre no mesmo horário, entre 08 e 10 horas da manhã.

A administração da pilocarpina (45 mg / kg / dia dissolvido em solução salina a 0,9%) foi realizada por via i.p. A dose da pilocarpina foi determinada tomando como referência o tratamento intraperitoneal com doses subconvulsivantes (GUEDES; VASCONCELOS, 2008). O metilnitrato de escopolamina, um antagonista do receptor muscarínico, foi administrado via i.p. (1 mg/kg/dia dissolvido em solução salina a 0,9%) 30 minutos antes da administração de pilocarpina ou salina para prevenir os efeitos colinérgicos periféricos provocados pela pilocarpina (PEIXINHO-PENA et al., 2012). Imediatamente após a administração de pilocarpina, os animais foram observados ao longo de 1 h para detecção de convulsões espontâneas, conforme medido pela escala de Racine (Racine, 1972) com as seguintes etapas: (0), nenhuma anormalidade; (1), movimentos bucais e faciais; (2) movimentos anormais da cabeça; (3) clonia dos membros anteriores; (4) elevação com clonia de patas anteriores; (5) elevação e queda com clonia de patas anteriores. Nesta dose baixa de pilocarpina, nenhum dos sinais acima descritos foi detectado nos animais do presente estudo.

A taurina (300 mg/Kg/dia), foi administrada diretamente no estômago pela técnica de gavagem, que consiste na inserção de uma sonda orogástrica, conectada a uma seringa de vidro (FRANCISCO e GUEDES, 2015; LIMA et al., 2017). A dose da taurina foi estabelecida a partir de trabalhos que trataram roedores por meio de gavagem (SVED et al., 2007; LIU et al., 2012; FRANCISCO e GUEDES, 2015).

5.3 DETERMINAÇÕES DE PESO CORPORAL, ENCEFÁLICO, CORTICAL E HIPOCAMPAL

Os pesos corporais dos animais foram aferidos com auxílio de uma balança eletrônica Filizola modelo MF-3/1 (capacidade de 3,0 Kg e escala em divisão de 0,5g), aos 7, 21, 35, 49 e 60 dias de vida, e no dia do registro eletrofisiológico. Ao término do registro, ainda sob efeito de anestesia, alguns animais tiveram seus encéfalos rapidamente removidos e congelados e outros foram perfundidos (ver item 5.7 e 5.8 respectivamente). Após esses procedimentos, os animais decapitados tiveram o córtex e o hipocampo pesados, enquanto nos ratos perfundidos foi obtido o peso encefálico, utilizando-se uma balança analítica (marca Shimadzu, modelo AUY220, com sensibilidade de até 0,1mg).

5.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes foram realizados sob condições de luminosidade e ruídos atenuados e registrados por uma câmera digital localizada verticalmente acima do aparelho conectada a um computador, no qual todos os testes foram gravados para posterior análise. Entre uma sessão de teste e outra, os aparelhos labirinto em cruz elevado (LCE) ou campo aberto (CA) foram limpos com papel toalha, embebido em etanol a 70%. Os testes foram analisados com auxílio do *software AnyMaze* (versão 4.99 m).

5.4.1 Labirinto em cruz elevado

No PND56, os animais foram submetidos ao teste do LCE, que consistiu em um aparelho de madeira em formato de cruz e com quatro braços (49x10 cm cada), elevados a 55 cm do solo. Dois dos braços eram abertos e outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, eram fechados por paredes laterais de 50 cm de altura. Os braços do aparelho eram unidos por uma plataforma central de 10x10 cm (Figura 6). No início do teste, cada animal foi colocado individualmente na área central do labirinto, com a cabeça direcionada para um dos braços abertos, podendo explorar livremente o equipamento durante 5 min (LIMA et al., 2017). Foram quantificados os seguintes parâmetros: distância percorrida (m), tempo total de imobilidade (s), número de entradas no braço aberto, o tempo de permanência no braço aberto (s) e a quantidade de bolos fecais expelidos pelo animal.

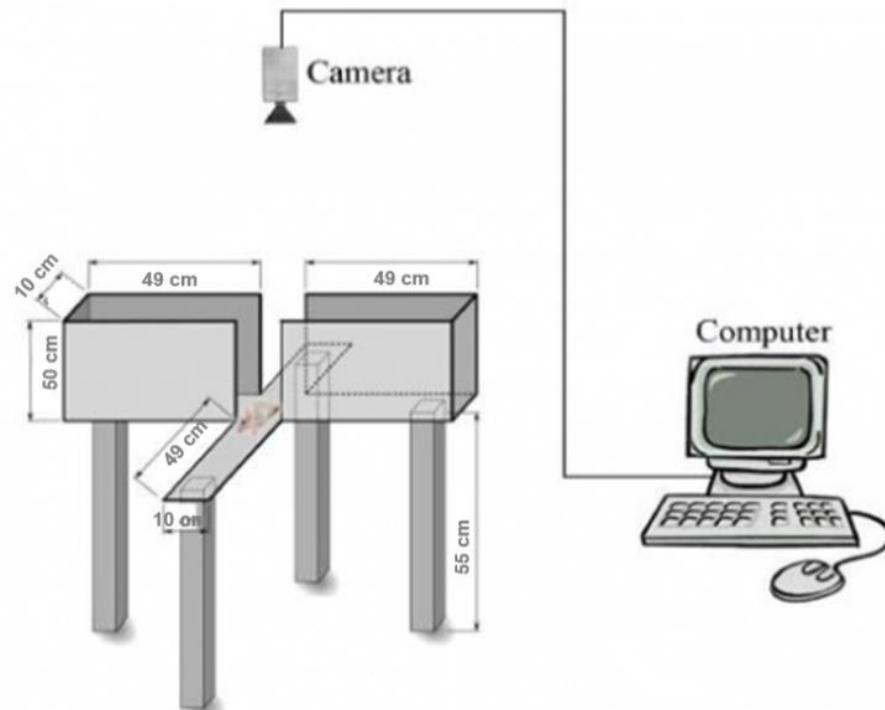


Figura 5. Representação esquemática do labirinto em cruz elevado

5.4.2 Campo aberto

No PND58, os animais foram testados no aparelho de campo aberto, que consistiu em uma arena circular com 89 cm de diâmetro circundada por parede circular com 52 cm de altura (Figura 7). No início do teste, o animal foi posicionado no centro do aparelho, e seu comportamento foi registrado durante 5 min por uma câmera digital localizada verticalmente acima do campo aberto. Foram quantificados a distância total percorrida (m), o tempo total de imobilidade (s), o número de entradas na zona central do aparelho, o tempo gasto (s) na zona central e a quantidade de bolos fecais expelidos pelo animal.

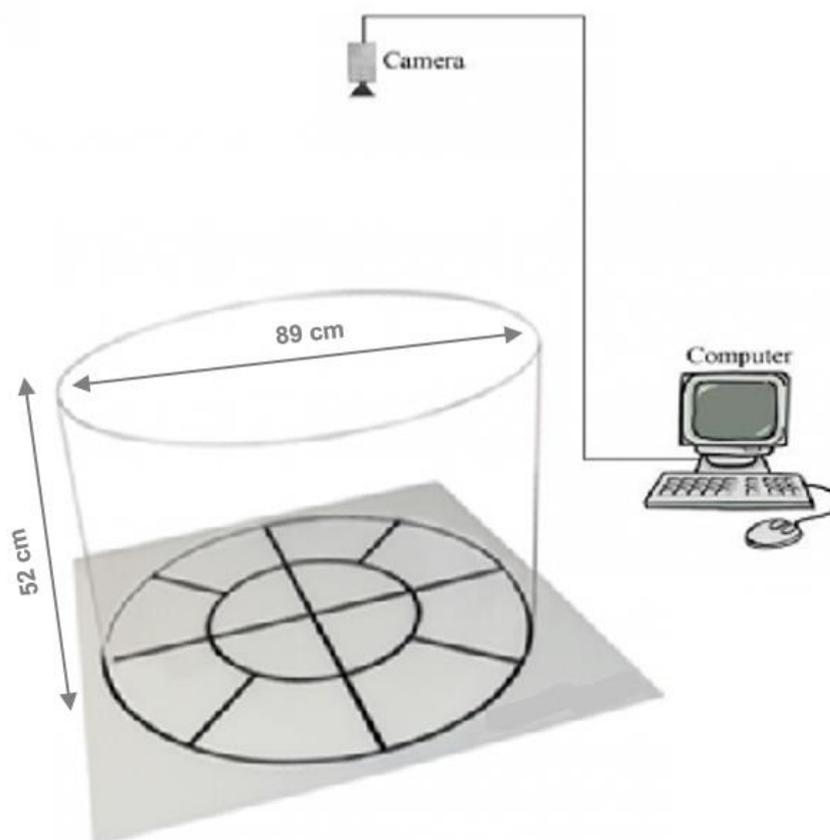


Figura 6. Representação esquemática do campo aberto

5.5 ANÁLISE DA GLICEMIA DE JEJUM

Após o segundo teste comportamental, os animais foram mantidos em jejum durante 6 horas. Em seguida, uma gota de sangue foi coletada da cauda do animal, e usada para medir o nível de glicose através de um medidor portátil G-TECH®

5.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

O registro eletrofisiológico da DAC foi realizado entre PND60 e PND65. Sob anestesia com uma mistura de 1 g/Kg de uretana + 40 mg/Kg de alfa-cloralose (i.p.), 3 orifícios no lado direito do crânio foram trepanados, para expor porções da superfície cortical. O orifício anterior (no osso frontal) foi utilizado para aplicação do estímulo que deflagrou a DAC; esta, ao se propagar, pode ser registrada nos outros dois orifícios posicionados no osso parietal com auxílio de eletrodos impolarizáveis do tipo “Ag-

AgCl". Durante 6 horas, o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de potencial DC (esta última característica do fenômeno da DAC) foram registrados em um sistema digital (Biopac MP150, USA) que permite a visualização e armazenamento dos registros em computador. Na figura 8 encontra-se o esquema do registro eletrofisiológico da DAC.

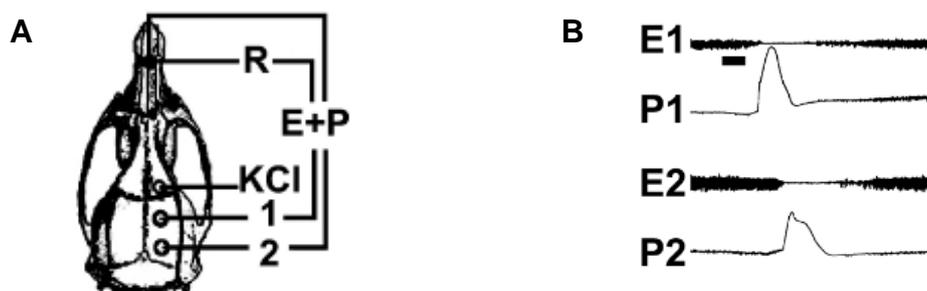


Figura 7. Esquema do registro eletrofisiológico da DAC. Em "A", desenho do crânio de um rato com a identificação dos três orifícios necessários ao experimento. O orifício "KCl" corresponde ao de estimulação. Nos pontos "1" e "2" são posicionados dois eletrodos, um em cada orifício, em contato direto com o córtex, para medir a variação lenta de voltagem (VLV) e o eletrocorticograma em relação a um ponto "R", situado no osso nasal do animal. Em "B", quatro traçados de registro em que a barra horizontal (abaixo do primeiro traçado) representa o tempo de 1 minuto (referente a presença do estímulo, KCl). "E1" e "E2" correspondem ao registro eletrocorticográfico. "P1" e "P2" correspondem ao registro da VLV nos pontos "1" e "2", respectivamente.

As duas primeiras horas do registro transcorreram sem a deflagração da DAC (sem qualquer estimulação). Na terceira hora, após um período de registro basal do ECoG, a DAC passou a ser provocada a cada 30 minutos por estimulação química na região frontal, sendo utilizado para isto o cloreto de potássio (KCl) a 2% (SILVA-GONDIM et al., 2017). Durante o registro, a temperatura retal do animal foi mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por meio de um aquecedor elétrico. A partir dos registros gravados foram calculados os seguintes parâmetros da DAC: 1) a velocidade de propagação do fenômeno; 2) a amplitude e a duração da sua variação lenta de voltagem; 3) amplitude do eletrocorticograma antes (período basal) e após o córtex cerebral passar a produzir episódios de DAC (SILVA-GONDIM et al., 2017; LIMA et al., 2017). A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer essa distância. Todas as informações sobre o animal foram anotadas em protocolo individual.

A análise da amplitude do ECoG foi realizada a partir de amostras do registro de aproximadamente 10 minutos, em seis pontos temporais do registro eletrofisiológico: dois no período inicial e quatro no período de deflagração da DAC.

Essas amostras foram analisadas, off-line, com o auxílio de um algoritmo implementado no *software* MATLAB™ (Mathworks, Natick, Massachusetts, U.S.A.), versão R2011B. Esse algoritmo calcula a amplitude média das ondas do ECoG. 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 os episódios da DAC, como base para analisar a ocorrência da potenciação da atividade elétrica espontânea (SOUZA et al., 2011; 2015; SILVA-GONDIM et al., 2017).

5.7 ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Após o registro da DAC, 50 animais (26 L₉ e 24 L₁₅), ainda anestesiados, foram decapitados. Os cérebros foram rapidamente removidos, pesados e congelados. O tecido cortical foi homogeneizado numa solução tampão Tris gelada e em seguida centrifugado durante 10 minutos a 1000 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para estimar a peroxidação lipídica através da medição dos níveis de malondialdeído (MDA) usando um método baseado em substâncias ativas do ácido tiobarbitúrico (OHKAWA et al., 1979), que é um parâmetro para avaliar a peroxidação lipídica. A reação foi desenvolvida por adição sequencial de 40 µl de dodecilsulfato de sódio a 8,1 %, 300 µl de ácido acético a 20 % (pH 3,5) e 300 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,8 % na alíquota homogeneizada de 300 µl em um banho de água em ebulição por 50 min. Após o arrefecimento dos tubos com água, adicionaram-se 300 µl de n-butanol à amostra. Os tubos foram centrifugados a 2500 g durante 10 minutos e a fase orgânica foi lida a 532 nm utilizando um leitor de placas. As experiências foram realizadas em triplicatas. As concentrações de proteína total foram determinadas com base no ensaio de proteína de Bradford, a albumina de soro bovino foi utilizada como padrão. As concentrações de MDA foram determinadas utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como padrão e expressas como µg/mg de proteína (MENDES-DA-SILVA et al., 2014).

5.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

Após o registro eletrofisiológico, ainda sob efeito de anestesia, 41 animais (21 L₉ e 20 L₁₅) foram submetidos à perfusão com solução salina 0,9% seguida de

paraformaldeído (PFA) 4% diluído em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M. Ao final da perfusão, os encéfalos foram retirados e pós-fixados com PFA por 4h e submetidos à crioproteção em soluções de sacarose de concentrações crescentes de 10%, 20% e 30%. Em seguida, cortes seriados longitudinais com 40 µm de espessura foram obtidos a -20°C por meio de um criostato (Leica-1850) e mantidos sob congelação (-20°C) para posterior análise.

Os encéfalos foram processados para imunomarcção com anticorpo anti-Iba1 (específico para micróglia) e anti-GFAP (específico para astrócitos). Destes 41 encéfalos, 1 foi direcionado como controle negativo (CN) da imunomarcção. Os 40 restantes foram divididos conforme a condição de lactação e tratamento recebido, como segue: 20-L₉ e 20-L₁₅, dos quais 8 foram ingênuo (4 L₉-Nv e 4-L₁₅-I), 8 veículo (4 L₉-V e 3-L₁₅-V), 8 taurina (4 L₉-T e 4-L₁₅-T), 8 pilocarpina (4 L₉-P e 4-L₁₅-P) e 8 pilocarpina + taurina (4 L₉-T+P e 4-L₁₅- T+P).

5.8.1 Análise imunohistoquímica para micróglia

Os cortes foram imunomarcados com anticorpo anti-Iba-1 (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japão), específico para microglia. Os cortes, em flutuação livre no meio de incubação, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena (2% de H₂O₂ em 70% metanol, durante 10 min). Depois, os cortes foram incubados durante 1 h em solução tampão de bloqueio (BB) contendo 0,05 M de solução salina tamponada com Tris (TBS), pH= 7,4, 10% de soro fetal de vitelo, 3% de albumina de soro bovino, e Triton X – 100 a 1%. Em seguida, os cortes foram incubados durante toda a noite a 4°C com anticorpo anti-Iba1 produzido em coelho (1:1.500 diluído em solução BB). Após três lavagens com TBS, mais 1% de Triton, os cortes foram incubados à temperatura ambiente durante 1h com anticorpos secundários anti-coelho biotinilado (1:500). Em seguida, os cortes foram lavados em TBS com Triton 1% e incubados em um conjugado com peroxidase de estreptavidina (1:500). A reação da peroxidase foi visualizada após a incubação dos cortes tampão Tris, contendo 0,5 mg/ml de (DAB) e 0,33 µl/ml de H₂O₂. Por fim, os cortes foram montados em lâminas de vidro, desidratados em álcoois graduados e xileno, e cobertas com lamínulas e Entellan® (LIMA et al., 2013).

5.8.2 Análise imunohistoquímica para astrócito

Os cortes foram imunomarcados com anticorpo anti-GFAP (Polyclonal Rabbit Anti-GFAP -D1F4Q- XP RABBIT MAB; Dako Denmark) específico para astrócitos. O protocolo experimental utilizado foi semelhante ao aplicado para marcação da micróglia, já referido acima, com a seguinte alteração: o anticorpo primário utilizado foi específico para marcação de astrócito na proporção de 1:2.400.

5.8.3 Análise densitométrica

As análises densitométrica do córtex cerebral (camada granular) e hipocampo (região-cornus Amoni 1- CA1) serão realizadas no hemisfério esquerdo para cada animal. Em cada corte, foram analisadas fotomicrografias de quatro campos dentro do córtex parietal e quatro campos na região CA1 do hipocampo usando o software Image J (National Institutes of Health, EUA; versão 1.46r). Um microscópio Leica-LMG, acoplado a uma câmera de alta resolução Samsung (modelo SHC-410NAD), foi utilizado para obtenção das imagens digitais dos cortes cerebrais. As imagens do córtex e do hipocampo foram obtidas com uma objetiva 20X. Para obtenção das imagens digitais, foram utilizadas as mesmas condições de intensidade de luz, em todos os grupos. Como parâmetros, foram analisadas a percentagem da área ocupada pelas células imunomarcadas, bem como a imunorreatividade total expressa em unidades arbitrárias.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças intergrupos foram analisadas utilizando-se a ANOVA de 2 vias, incluindo a condição nutricional (L₉ e L₁₅) e o tratamento (ingênuo, veículo, taurina, pilocarpina e pilocarpina + taurina) como fatores, seguida pelo teste de Holm-Sidak quando necessário. Os valores das amplitudes do ECoG antes e após a DAC, para cada animal, foram normalizados e expressos em unidades relativas. As diferenças nessas amplitudes, antes e após a DAC, foram analisadas utilizando o Teste t pareado. Comparações intergrupos foram realizadas mediante ANOVA seguida do teste de Holm-Sidak, quando indicado. Sendo aceitas como significantes as diferenças em que $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DO 1º DESENHO EXPERIMENTAL

6.1.1 Peso corporal

Na Figura 9, em todos os grupos de tratamento (Nv, V e P), para as duas condições de lactação L₉ e L₁₅, a ANOVA mostrou um efeito principal da condição de lactação no peso corporal ($p < 0,001$). Os animais L₁₅ apresentaram menor peso corporal em comparação com os grupos L₉. A redução de peso variou de 20,1% a 36,5% e foi independente do tratamento. Na condição de lactação normal (L₉), a diferença intergrupar foi observada somente em PND49 [$F(2,41) = 22,502$; $p < 0,001$]. O tratamento com pilocarpina foi associado à redução de peso, em comparação com os respectivos grupos de controle L₉. Na condição de lactação desfavorável (L₁₅), a pilocarpina reduziu o peso corporal em PND49 e PND60 [$F(2,39) = 14,785$; $p < 0,001$].

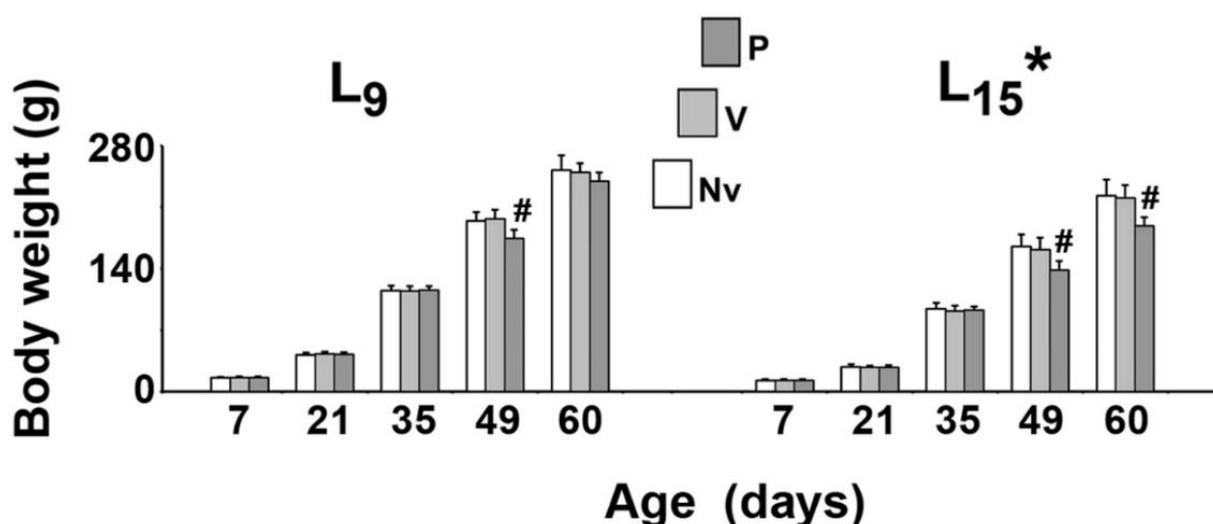


Figura 8. Peso corporal de ratos previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Ingênuo (Nv); Veículo (V); Pilocarpina (P). A administração de pilocarpina ou veículo ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente. # $p < 0,001$ em comparação com grupos controle na mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.1.2 Glicemia de jejum

Nos grupos controle da condição L₁₅, a glicemia foi significativamente menor do que os grupos L₉ correspondentes [$F(1,35) = 22,990$; $p < 0,001$]. O tratamento com pilocarpina reduziu os níveis de glicose no L₉, mas não nos grupos L₁₅ [$F(2,35) = 9,709$; $p < 0,001$] em comparação com os grupos controle correspondentes (ingênuo e veículo). Os dados sobre a glicemia estão ilustrados na Figura 10.

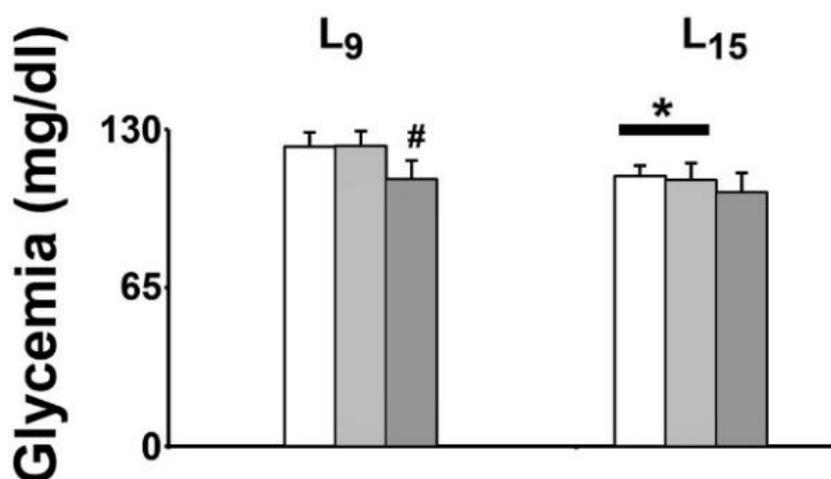


Figura 10. Níveis de glicose no sangue de ratos aos 58 dias de vida previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina. Todas as drogas foram dissolvidas em 0,9% de salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente. # $p < 0,001$ em comparação com grupos controle na mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.1.3 Atividade comportamental no campo aberto

O efeito da administração de pilocarpina sobre a atividade comportamental no teste de campo aberto está disposto na Figura 11. Comparado com os controles ingênuo (Nv) e veículo (V), o grupo L₉ tratado com pilocarpina (P) entrou na área central um número menor de vezes (P, $4,3 \pm 1,9$ versus Nv, $9,6 \pm 2,4$ e V, $9,6 \pm 5,0$ vezes; $p < 0,001$), expeliu um maior número de bolos fecais (P, $5,9 \pm 1,1$ versus Nv, $2,9 \pm 1,5$ e V, $2,8 \pm 1,0$; $p < 0,001$), percorreram uma distância menor na arena circular

(P, $19,5 \pm 6,2$ m versus Nv, $28,1 \pm 9,7$ m e V, $29,1 \pm 5,8$ m; $p < 0,001$) e permaneceu em imobilidade por mais tempo (P, $49,1 \pm 23,9$ s versus Nv, $27,2 \pm 11,8$ s e V, $26,4 \pm 11,7$ s, $p < 0,001$). Não houve diferença para o tempo na área central (P, $12,7 \pm 4,9$ s versus Nv, $18,9 \pm 5,0$ s e V, $17,7 \pm 11,8$ s).

Na condição de L₁₅, o grupo tratado com pilocarpina entrou um número menor de vezes na área central (P, $3,1 \pm 1,3$ versus Nv, $6,7 \pm 1,8$ e V, $5,0 \pm 2,7$), permaneceu um tempo menor na área central (P, $11,4 \pm 4,1$ s versus Nv, $19,7 \pm 4,9$ s e V, $19,7 \pm 6,4$ s, $p = 0,007$), expulsou um maior número de bolos fecais (P, $5,4 \pm 1,4$ versus Nv, $2,6 \pm 1,8$ e V, $2,9 \pm 2,2$), percorreram uma distância mais curta na arena circular ($20,81 \pm 4,70$ m versus $29,09 \pm 3,31$ m e $28,55 \pm 6,04$ m) e permaneceu mais tempo em imobilidade (P, $52,3 \pm 13,9$ s versus Nv, $25,4 \pm 8,2$ s e V, $24,3 \pm 8,2$ s).

Open field

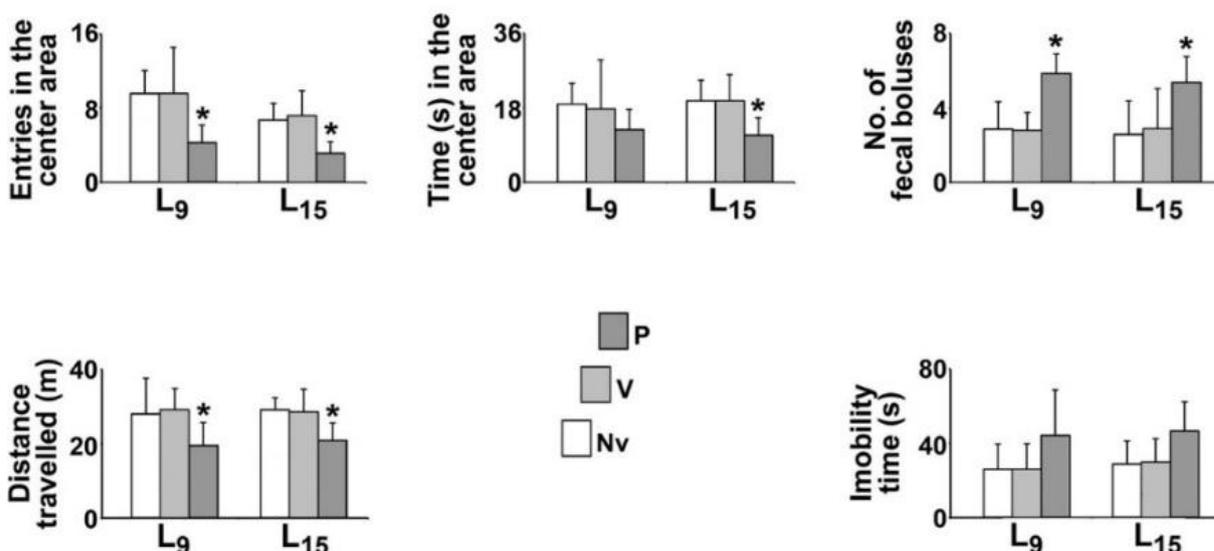


Figura 10. Atividade comportamental no teste de campo aberto de ratos aos 58 dias previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina. Todas as drogas foram dissolvida em 0,9% de salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p = 0,007$ para o tempo na área central em comparação com os grupos controle na mesma condição de lactação e $p < 0,001$ para outros parâmetros (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.1.4 Parâmetros da depressão alastrante cortical

Em todos os grupos, a aplicação tópica com KCl a 2% em um ponto frontal da superfície cortical durante 1 min provocou, como regra geral, uma única onda DAC que se propagou sem interrupção e foi registrada nos dois pontos de registro parietal (Figura 12-A; os pontos de registro no diagrama do crânio). Durante as 4 horas da sessão de registro, a variação lenta de potencial DC, que apareceu consistentemente após a estimulação com KCl, confirmou a presença da DAC.

Nos animais L₉, as velocidades da DAC (média ± SD em mm/min) nos grupos ingênuo, veículo e pilocarpina foram respectivamente de 3,69 ± 0,13; 3,70 ± 0,10 e 3,11 ± 0,15. Nos animais L₁₅, as velocidades da DAC para os grupos naïve, veículo e pilocarpina foram respectivamente 4,20 ± 0,17; 4,18 ± 0,18 e 2,93 ± 0,23. A ANOVA indicou um efeito principal da condição de lactação [$F(1,46) = 33,575$; $p < 0,001$] e as comparações do teste post hoc (Holm-Sidak) mostraram que as velocidades foram maiores nos grupos L₁₅ em comparação com os grupos L₉. A ANOVA também detectou um efeito principal do tratamento [$F(2,46) = 173,067$; $p < 0,001$], e o teste post hoc revelou que o tratamento com pilocarpina reduziu significativamente a velocidade de propagação da DAC em comparação com os controles ingênuo e veículo correspondentes. O efeito de desaceleração da pilocarpina sobre a velocidade de propagação da DAC foi mais intenso na condição L₁₅ do que em ratos L₉ [$F(2,46) = 22,658$; $p < 0,001$], indicando uma interação entre o tratamento com pilocarpina e a condição de lactação. Os dados de velocidade da DAC são mostrados na Figura 12-B.

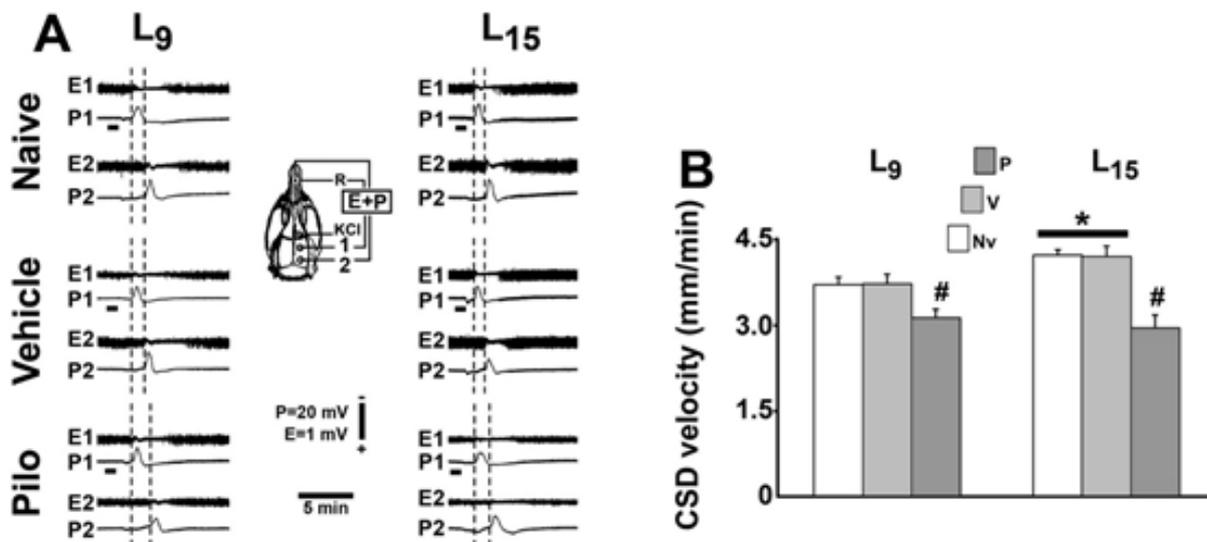


Figura 11. A. Eletrocorticograma (E) e variação lenta de potencial DC (P) durante a passagem da depressão alastrante cortical (DAC), registrados em dois pontos corticais (1 e 2) em ratos dos 60-65 dias previamente amamentados com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina. Todas as drogas foram dissolvidas em 0,9% de salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. O diagrama do crânio mostra as posições de registro 1 e 2. A posição do eletrodo de referência comum (R) nos ossos nasais e o ponto de aplicação do estímulo para deflagração da DAC (KCl) também são mostrados. A DAC foi provocada no córtex frontal por estimulação química (uma bola de algodão de 1 a 2 mm de diâmetro embebida com 2% de KCl) aplicada durante 1 min na dura-máter intacta, conforme indicado pelas barras horizontais. As latências são mais curtas nos grupos L₁₅ em comparação com os correspondentes grupos L₉. No grupo tratado com pilocarpina, as latências são aumentadas em comparação com os respectivos controles ingênuo e veículo. **B.** Velocidade da DAC. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente. # $p < 0,001$ em comparação com os grupos controle na mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

A Tabela 3 mostra os dados sobre amplitude e duração da variação lenta de potencial DC, que é a marca registrada da DAC. A ANOVA indicou um efeito principal da condição de lactação sobre a amplitude da onda de DAC [$F(1,42) = 8,16$; $p = 0,007$], e uma comparação pelo teste post hoc (Holm-Sidak) mostrou que as amplitudes eram maiores no ingênuo e no veículo L₁₅ em comparação com os correspondentes grupos L₉. O tratamento também afetou a amplitude [$F(2,42) = 9,490$; $p < 0,001$] e o teste post hoc mostrou que a amplitude foi menor no grupo pilocarpina L₁₅, mas não no grupo tratado com pilocarpina L₉, em comparação com os grupos controles ingênuo e veículo correspondentes. A ANOVA também confirmou uma interação entre ambos os fatores [$F(2,42) = 8,999$; $p < 0,001$].

A análise da duração da DAC indicou um efeito principal da condição de lactação ($F(1,47) = 84,1997$; $p < 0,001$) e tratamento [$F(2,47) = 3,22$; $p = 0,047$], bem como uma interação entre esses dois fatores [$F(2,47) = 3,667$; $p = 0,033$]. O teste de Holm-Sidak indicou uma duração mais curta nos grupos L₁₅ em comparação com os grupos L₉ correspondentes e uma duração mais longa nos animais tratados com pilocarpina L₁₅ em comparação com os grupos controle ingênuo e veículo correspondente.

Tabela 3 - Amplitude e duração da variação lenta de potencial DC da depressão alastrante cortical em ratos machos previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina. Todas as drogas foram dissolvidas em 0,9% de salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55.

Grupo	Amplitude (mV)	Duração (s)
L₉		
Ingênuo	8,4 ± 1,8 (9)	69,6 ± 2,3 (9)
Veículo	8,5 ± 1,1 (9)	70,1 ± 2,6 (9)
Pilocarpina	8,4 ± 1,1 (9)	69,7 ± 1,3 (9)
L₁₅		
Ingênuo	11,1 ± 2,5 (6)#	64,4 ± 0,9 (8)#
Veículo	11,0 ± 1,5 (7)#	64,8 ± 1,1 (9)#
Pilocarpina	7,0 ± 1,2 (8)*	67,2 ± 1,2 (9)*#

Dados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. * $p < 0,001$ em comparação com grupos controle na mesma condição de lactação. # $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2 RESULTADOS DO 2º DESENHO EXPERIMENTAL

6.2.1 Peso corporal e encefálico

Na Figura 13-A, em todos os grupos de tratamento (Nv, V, T, P e T+P), para as duas condições de lactação L₉ e L₁₅, a ANOVA mostrou um efeito principal da condição de lactação no peso corporal ($p < 0,001$). Os animais L₁₅ apresentaram menor peso corporal em comparação com os grupos L₉. A redução de peso variou de

11,9% a 32,5% nos grupos em que não foi observado efeito dependente do tratamento. Na condição de lactação normal (L_9), a diferença intergrupar foi observada somente em PND49 [$F(4,85) = 15,048$; $p < 0,001$]. O tratamento com pilocarpina foi associado à redução de peso, em comparação com os respectivos grupos controle L_9 . Na condição de lactação desfavorável (L_{15}), a pilocarpina e/ou sua associação com a taurina reduziu o peso corporal em PND49 e PND60 [$F(4,79) = 11,993$; $p < 0,001$].

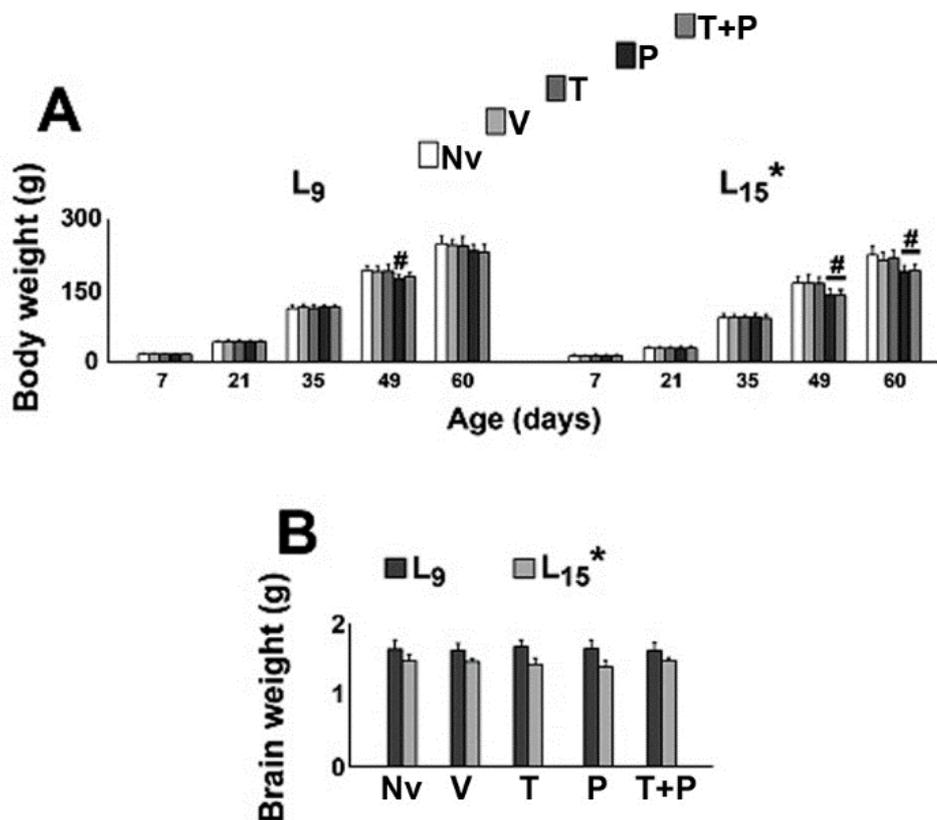


Figura 12. Peso corporal em **A** e encefálico em **B** de ratos previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L_9 e L_{15}). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. Todas as drogas foram dissolvida em 0,9% de salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L_9 correspondente. # $p < 0,001$ em comparação com grupos controle na mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

Para os dados de peso encefálico, mostrados na figura 13-B, todos os grupos de tratamento (Nv, V, T, P e T+P) para as duas condições de lactação L_9 e L_{15} , a ANOVA mostrou um efeito principal da condição de lactação no peso corporal [$F(1,41)$

= 51,659; $p < 0,001$). Os animais L₁₅ apresentaram menor peso encefálico em comparação com os grupos L₉. A redução de peso foi de 17,03% e foi independente do tratamento.

6.2.2 Atividade comportamental no labirinto em cruz elevado

O efeito da administração de taurina e/ou pilocarpina sobre a atividade comportamental no teste de labirinto em cruz elevado está disposto na Figura 14. Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos, a ANOVA identificou um efeito principal do tratamento [$F(4,76) = 10,653$; $p < 0,001$]. O teste de Holm-Sidak revelou que o grupo L₉ tratado com taurina esteve nos braços abertos por mais tempo comparado aos outros grupos de mesma condição de lactação. Na condição L₉ essa diferença se mostrou para todos os outros 4 grupos (T, 57,4 ± 31,5 s *versus* Nv, 31,2 ± 14,6 s; V, 30,2 ± 15,2 s; P, 18,7 ± 11,9 s e T+P, 26,3 ± 14,8 s). Já na condição L₁₅ essa diferença foi significativa comparada aos grupos Nv, V e P, mas não ao T+P (T, 75,0 ± 37,4 s *versus* Nv, 26,4 ± 19,0 s; V, 28,9 ± 17,5 s; P, 16,1 ± 10,5 s e T+P, 35,7 ± 16,4 s).

O número de entradas nos braços abertos apresentou efeito principal do tratamento [$F(4,81) = 6,259$; $p < 0,001$] apenas na condição L₁₅. O Holm-sidak indicou que os grupos P e T+P entraram um menor número de vezes nos braços abertos comparados aos grupos NV, V e T (P, 5,0 ± 2,2; T+P, 5,3 ± 2,3 *versus* Nv, 10,3 ± 3,7; V, 9,6 ± 2,3 e T, 10,3 ± 3,3). Na condição L₉ as médias do número de entradas foram Nv, 8,0 ± 3,5; V, 8,4 ± 2,8; T, 7,6 ± 3,1; P, 6,2 ± 2,7 e T+P, 8,2 ± 1,5. A análise estatística também detectou interação entre o tratamento e a condição de lactação [$F(4,81) = 3,339$; $p = 0,014$] revelando que o T-L₁₅ entrou um número maior de vezes nos braços abertos e o T+P -L₁₅ um número menor de vezes quando comparados aos seus respectivos grupos L₉.

Com relação à distância total percorrida pelos animais no LCE, a ANOVA identificou efeito principal da condição de lactação [$F(1,80) = 5,445$; $p = 0,022$], do tratamento [$F(4,80) = 19,010$; $p < 0,001$] e uma interação entre os dois fatores citados [$F(4,80) = 2,697$; $p = 0,036$]. O grupo T-L₉ percorreu uma maior distância comparados aos grupos Nv, V, P e T+P de mesma condição de lactação e o grupo P-L₉, uma menor distância comparado a Nv, V e T-L₉ (T, 14,1 ± 2,8 m e P, 7,8 ± 2,4 m *versus* Nv, 11,2 ± 1,4 m; V, 10,8 ± 1,6 m e T+P, 9,1 ± 2,0 m). Na condição L₁₅ os grupos P e T+P

percorreram uma menor distância comparados aos grupos Nv, V e T (P , $9,5 \pm 1,7$ m e $T+P$, $10,0 \pm 1,5$ m *versus* Nv, $13,2 \pm 1,7$ m; V, $12,5 \pm 1,7$ m e T, $12,5 \pm 1,5$ m). O grupo Nv-L₁₅ percorreu uma maior distância quando comparados ao seu respectivo L₉.

A ANOVA identificou efeito principal do tratamento para a imobilidade total dos animais [$F(4,81) = 8,137$; $p < 0,001$] e o pós-teste Holm-Sidak revelou que o grupo P apresentou o maior tempo de imobilidade comparado aos grupos Nv, V e T em ambas as condições de lactação. As médias dos valores para o tempo de imobilidade dos animais foram: para condição L₉ (P , $55,8 \pm 15,2$ s *versus* Nv, $34,3 \pm 9,3$ s; V, $33,0 \pm 10,0$ s; T, $28,4 \pm 14,9$ s e $T+P$, $42,4 \pm 20,2$ s) e para condição L₁₅ (P , $53,9 \pm 18,2$ s *versus* Nv, $28,9 \pm 17,9$ s; V, $30,3 \pm 15,7$ s; T, $29,5 \pm 18,4$ s e $T+P$, $41,1 \pm 16,0$ s).

A quantidade de bolos fecais expelida por cada animal durante o período da realização do teste comportamental apresentou efeito principal do tratamento, segundo a ANOVA [$F(4,81) = 6,498$; $p < 0,001$] e o pós-teste Holm-Sidak revelou que o grupo P-L₉ expeliu maior número de bolos fecais comparado aos grupos Nv, V e T (P , $4,4 \pm 2,4$ *versus* Nv, $2,0 \pm 1,8$; V, $1,8 \pm 1,5$; T, $1,5 \pm 1,4$ e $T+P$, $2,5 \pm 2,0$). Na condição L₁₅ essa diferença se mostrou presente quando comparado aos grupos T e $T+P$ da mesma condição nutricional (P , $3,6 \pm 1,3$ *versus* T, $0,7 \pm 1,0$; $T+P$, $2,4 \pm 1,1$; Nv, $1,9 \pm 1,6$ e V, $1,9 \pm 1,4$).

Elevated plus-maze

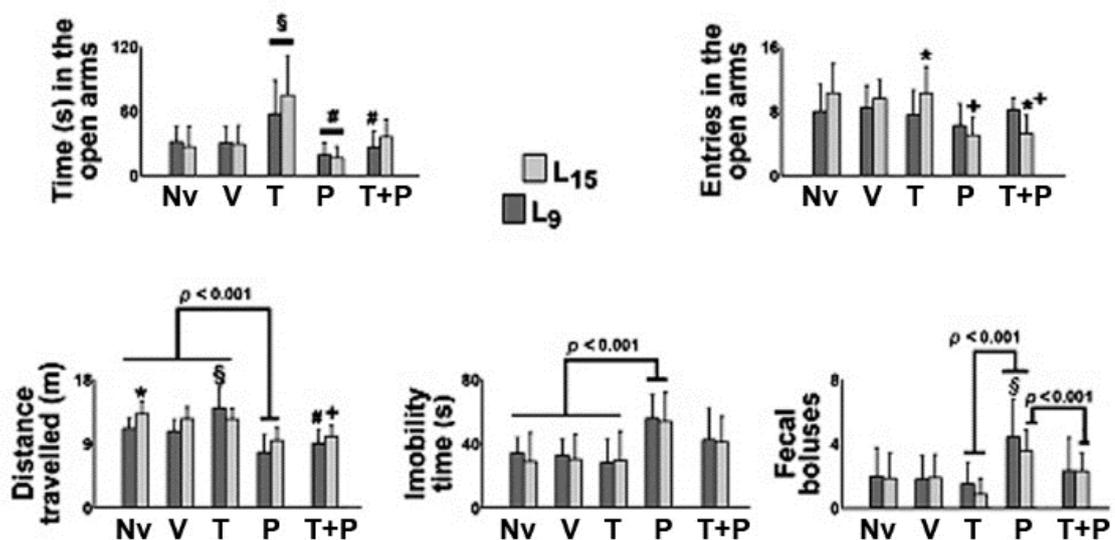


Figura 13. Atividade comportamental no teste de labirinto em cruz elevado aos 56 dias de vida de ratos previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0.001$ comparado com a condição L₉ correspondente. § $p < 0.001$ comparado com grupos Nv e V na mesma condição de lactação. # $p < 0.001$ comparado ao grupo T de mesma condição de lactação. + $p < 0.001$ comparado aos grupos Nv, V e T de mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2.3 Glicemia de jejum

Nos grupos ingênuo, veículo e taurina da condição L₁₅, a glicemia foi menor comparado aos grupos L₉ correspondentes [$F(1,77) = 33,484$; $p < 0,001$]. Os tratamentos com P e T+P reduziram os níveis de glicose no L₉, mas não nos grupos L₁₅ [$F(4,77) = 4,122$; $p = 0,004$] em comparação com os grupos controle correspondentes (Nv, V e T). Os dados sobre a glicemia estão ilustrados na Figura 15.

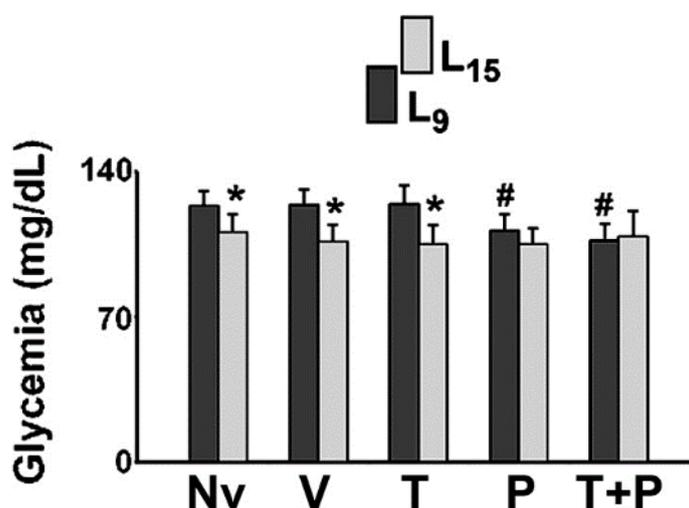


Figura 14. Níveis de glicose no sangue de ratos machos aos 58 dias de vida previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Pilocarpina+taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou

pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente. # $p < 0,001$ em comparação com grupos Nv, V e T na mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2.4 Parâmetros relacionados à DAC

6.2.4.1 Velocidade de propagação da DAC

Em todos os grupos experimentais, a estimulação com 2% de KCl (aproximadamente 270 mM) em um ponto da superfície cortical frontal durante 1 minuto provocou, em regra, uma única onda de DAC que se propagou sem interrupção e foi registrado e gravado nos dois pontos da região parietal. Durante todo o período de registro, a variação lenta de voltagem (VLV), e a diminuição da atividade elétrica espontânea cortical no ECoG, confirmaram a presença da DAC após a estimulação com KCl.

Nos animais L₉, os valores obtidos das velocidade da DAC (mean \pm SD in mm/min) para os grupos Nv, V, T, P e T+P foram respectivamente $3,71 \pm 0,12$; $3,73 \pm 0,12$; $3,15 \pm 0,17$; $3,12 \pm 0,15$ e $3,02 \pm 0,20$. Nos L₁₅, as velocidades da DAC dos grupos Nv, V, T, P e T+P foram respectivamente $4,20 \pm 0,16$; $4,17 \pm 0,15$; $3,40 \pm 0,11$; $3,04 \pm 0,19$ e $2,94 \pm 0,22$. A ANOVA indicou diferenças entre os grupos, e o teste post-hoc (Holm-Sidak) revelou que as velocidades foram maiores na condição L₁₅ em comparação com a condição L₉ para os grupos ingênuo, veículo e taurina [$F(1,81) = 34,876$; $p < 0,001$]. A ANOVA também detectou um efeito principal do tratamento [$F(4,81) = 150,675$; $p < 0,001$], e o teste post-hoc mostrou que o tratamento com T, P e T+P reduziu as velocidades de propagação da DAC quando comparados com os grupos controle ingênuo e veículo. A ANOVA identificou interação entre o estado nutricional e o tratamento [$F(4,81) = 12,739$; $p < 0,001$], em que os grupos L₁₅ P e T+P apresentaram velocidades de propagação da DAC menores comparados aos grupos Nv, V e T. Nenhuma diferença foi observada entre os animais L₉ e L₁₅ tratados com P e T+P. Os dados sobre a velocidade de propagação da DAC estão na Figura 16.

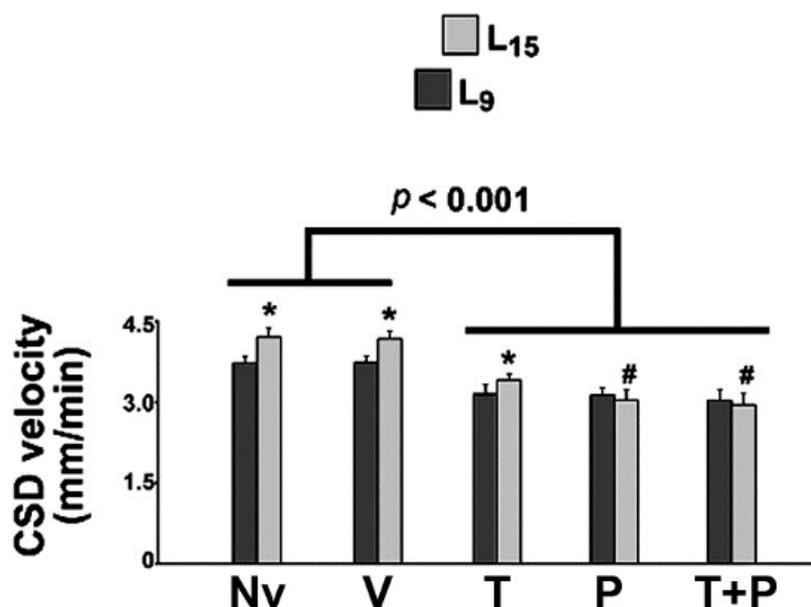


Figura 15. Velocidade de propagação da DAC de ratos submetidos às duas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Pilocarpina+taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente. # $p < 0,001$ comparado com grupos Nv, V e T na mesma condição de lactação. § $p < 0,001$ comparado com os grupos Nv e V para ambas as condições de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2.4.2 Amplitude e duração da variação negativa lenta de potencial da DAC

A Tabela 4 mostra os dados sobre amplitude e duração da variação negativa lenta de potencial DC, nos animais da segundo desenho experimental da presente tese. A ANOVA indicou um efeito principal da condição de lactação sobre a amplitude da onda de DAC [$F(1,81) = 11,408$; $p < 0,001$], e o teste post hoc (Holm-Sidak) mostrou que as amplitudes eram maiores nos grupos Nv, V e T-L₁₅ em comparação com os correspondentes grupos L₉. O tratamento também afetou a amplitude [$F(4,81) = 3,274$; $p = 0,015$] e o teste post hoc mostrou que a amplitude foi menor no grupo P-L₁₅, mas não no grupo tratado com pilocarpina L₉, em comparação com os grupos Nv, V e T correspondentes. A ANOVA também confirmou uma interação entre ambos os fatores [$F(4,81) = 2,934$; $p = 0,026$].

A análise da duração da DAC indicou um efeito principal da condição de lactação [$F(1,81) = 115,827$; $p < 0,001$] e tratamento [$F(4,81) = 5,291$; $p < 0,001$]. O Holm-Sidak indicou uma menor duração nos grupos L₁₅ em comparação com os grupos L₉ correspondentes e uma duração mais longa nos animais tratados com pilocarpina L₁₅ em comparação com os grupos Nv, V e T correspondentes.

Tabela 4 - Amplitude e duração da variação lenta de potencial DC da depressão alastrante cortical em ratos previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Pilocarpina+taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55.

Grupo	Amplitude (mV)	Duração(s)
L₉		
Ingênuo	8,5 ± 1,6 (10)	69,2 ± 2,6 (10)
Veículo	8,6 ± 1,0 (10)	69,2 ± 2,6 (10)
Taurina	8,6 ± 1,2 (9)	69,3 ± 2,2 (9)
Pilocarpina	8,4 ± 1,1 (9)	70,9 ± 2,7 (9)
Pilocarpina+taurina	9,3 ± 1,5 (8)	70,3 ± 1,9 (9)
L₁₅		
Ingênuo	10,6 ± 3,1 (7)*	64,7 ± 0,6 (7)*
Veículo	10,8 ± 1,8 (8)*	65,1 ± 0,8 (11)*
Taurina	10,7 ± 1,6 (9)*	65,1 ± 0,5 (9)*
Pilocarpina	7,5 ± 1,9 (10)+	67,9 ± 1,0 (10)#*
Pilocarpina+taurina	9,6 ± 2,2 (11)	65,2 ± 1,3 (11)*

Dados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. * $p < 0,001$ em comparação com a condição L₉ correspondente. # $p = 0,015$ comparado com os grupos ingênuo, veículo e taurina de mesma condição de

lactação. + $p < 0.001$ comparado com os outros quatro grupos de mesma condição de lactação (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2.4.3 Potenciação da amplitude do ECoG induzida pela DAC

Amostras de registros da amplitude do ECoG nos pontos 1 (E1) e 2 (E2) de registro, antes e após a passagem da DAC estão dispostos na figura 17. O teste t pareado mostrou que para todos os grupos, nos dois pontos de registro, no mesmo animal, a amplitude do ECoG no período pós-DAC foi significativamente ($p < 0,005$) maior do que no período basal (potenciação).

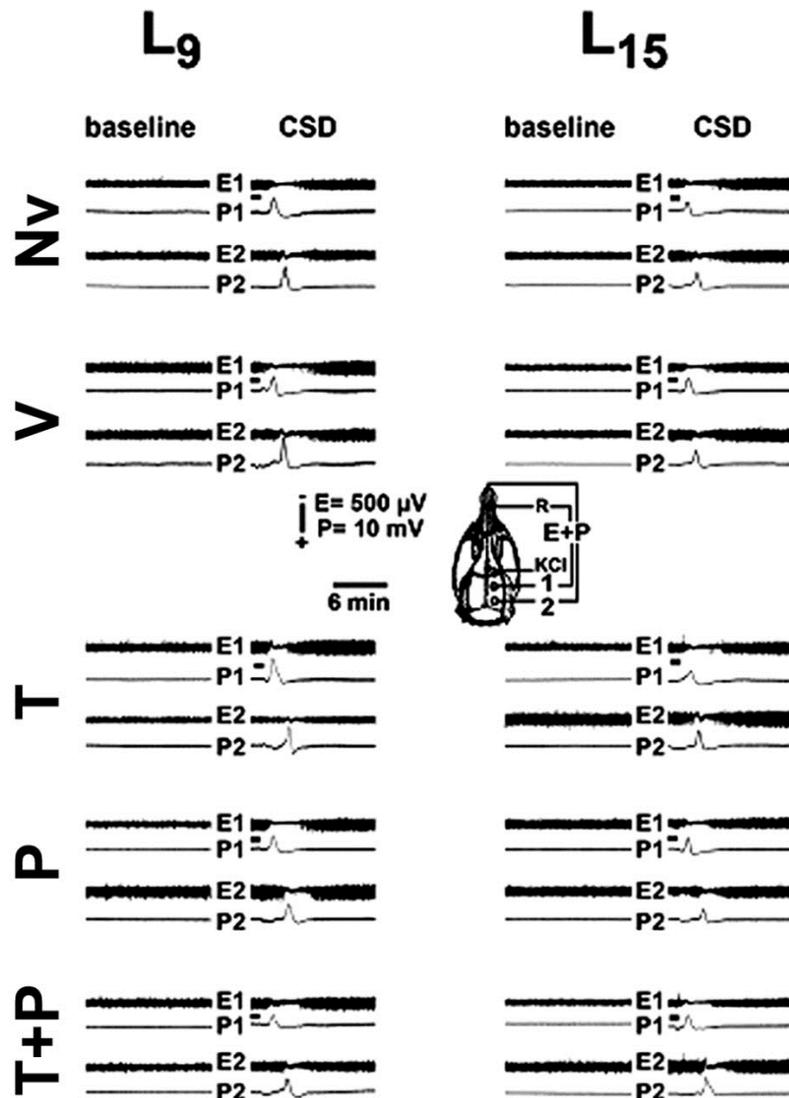


Figura 16. Eletrocorticograma (E) e variação negativa lenta do potencial (P) em dois pontos da superfície do hemisfério direito, antes (Baseline) e após a passagem da depressão alastrante cortical (CSD) de ratos submetidos às duas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo (Nv) = nenhum tratamento; veículo (V) = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina (T) =

metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina (P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina (T+P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55.

No ponto 1 de registro, a ANOVA indicou um efeito principal da condição de lactação sobre a amplitude da onda de DAC [F (1,81) = 18,982; $p < 0,001$], e uma comparação pelo teste post hoc (Holm-Sidak) mostrou que o aumento nas amplitudes em E1 foram menores nos grupos ingênuo e veículo L₁₅ em comparação com os correspondentes grupos L₉. O tratamento também afetou a amplitude do ECoG em E1 [F (4,81) = 12,071; $p < 0,001$] e o teste post hoc mostrou que a amplitude do ECoG foi menor nos grupos taurina, pilocarpina e pilocarpina+taurina da condição L₉ em comparação com os grupos ingênuo, veículo de mesma condição de lactação. Efeito do tratamento também foi observado na condição L₁₅, no qual o grupo pilocarpina apresentou menor aumento da amplitude em comparação aos controles ingênuo e veículo na mesma condição de lactação. Em E2, ANOVA não identificou diferenças significativas na amplitude do ECoG. Os dados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Amplitude do ECoG, nos pontos 1 e 2 de registro, antes (Basal) e após a deflagração da depressão alastrante cortical (DAC), em ratos previamente amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (respectivamente, condição L₉ e L₁₅). Os grupos são: Ingênuo = nenhum tratamento; veículo = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina; Pilocarpina+taurina = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina. Todas as drogas foram dissolvida em 0,9% de salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. O ECoG foi inicialmente registrado por 2 h, sem deflagração da DAC, para se obter um valor basal. Nas 4 horas seguintes de registro, a DAC foi evocada em intervalos de 30 min. Em cada hora de registro, uma amostra de 10 minutos do ECoG foi analisada por meio de um algoritmo implementado no software MATLAB™.

Grupo	ECoG 1		ECoG 2	
	Basal	DAC	Basal	DAC
L ₉				
Naïve	1,01 ± 0,01 (10)	1,63 ± 0,25*	1,04 ± 0,04 (10)	1,28 ± 0,21*
Vehicle	1,04 ± 0,04 (10)	1,67 ± 0,22*	1,04 ± 0,04 (10)	1,33 ± 0,14*

Taurine	1,00 ± 0,00 (9)	1,40 ± 0,11* #	1,02 ± 0,04 (9)	1,32 ± 0,13*
Pilocarpine	1,01 ± 0,03 (9)	1,30 ± 0,08* #	1,02 ± 0,03 (9)	1,22 ± 0,13*
Pilocarpine+taurine	1,02 ± 0,04 (8)	1,43 ± 0,16* #	1,05 ± 0,08 (8)	1,35 ± 0,09*
L ₁₅				
Naïve	1,02 ± 0,04 (7)	1,43 ± 0,22* +	1,03 ± 0,05 (7)	1,25 ± 0,15*
Vehicle	1,05 ± 0,05 (8)	1,46 ± 0,11* +	1,01 ± 0,02 (8)	1,25 ± 0,14*
Taurine	1,08 ± 0,10 (9)	1,47 ± 0,25*	1,04 ± 0,05 (9)	1,24 ± 0,09*
Pilocarpine	1,03 ± 0,10 (8)	1,21 ± 0,12* §	1,03 ± 0,06 (8)	1,16 ± 0,11*
Pilocarpine+taurine	1,03 ± 0,05 (11)	1,39 ± 0,10*	1,03 ± 0,06 (11)	1,27 ± 0,09*

Dados expressos como média ± desvio padrão, apresentados como unidades relativas (valores das amplitudes normalizadas em relação ao menor valor, que foi considerado igual a 1) com o número de animais entre parênteses. * $p < 0,005$ em comparação com a amplitude antes da DAC na mesma condição de lactação, nos mesmos animais (teste t pareado). # $p < 0,001$ comparado ao ingênuo e veículo de mesma condição de lactação. § $p < 0,001$ comparado aos outros quatro grupos na mesma condição de lactação. + $p < 0,001$ comparado com L₉ correspondente (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2.5 Níveis de malondialdeído no córtex e hipocampo

As medições dos níveis de MDA nos córtex e hipocampo cerebrais são mostrados na Figura 18. ANOVA não revelou diferenças significantes.

No córtex, os valores de MDA (média ± SD em nmol/mg de proteína), na condição L₉, nos grupos ingênuo, veículo, taurina, pilocarpina e pilocarpina + taurina foram respectivamente de 1,02 ± 0,23; 1,02 ± 0,30; 0,68 ± 0,20; 1,30 ± 0,26 e 0,97 ± 0,42. Nos animais L₁₅, os níveis de MDA para os grupos ingênuo, veículo, taurina, pilocarpina e pilocarpina + taurina foram respectivamente 1,27 ± 0,34; 1,27 ± 0,39; 1,07 ± 0,20; 1,63 ± 0,42 e 1,36 ± 0,39. Os dados dos níveis de MDA no tecido cortical são mostrados na Figura 18 (painel esquerdo).

No hipocampo, os valores de MDA (média ± SD em nmol / mg de proteína), animais L₉, nos grupos ingênuo, veículo, taurina, pilocarpina e pilocarpina + taurina foram respectivamente de 1,34 ± 0,50; 1,16 ± 0,41; 0,84 ± 0,25; 1,72 ± 0,66 e 1,00 ± 0,31. Nos animais L₁₅, os níveis de MDA para os grupos ingênuo, veículo, taurina,

pilocarpina e pilocarpina + taurina foram respectivamente $2,30 \pm 1,08$; $2,24 \pm 1,44$; $2,06 \pm 1,36$, $2,74 \pm 1,26$ e $2,21 \pm 0,80$. Os dados dos níveis de MDA no hipocampo são mostrados na Figura 18 (painel direito).

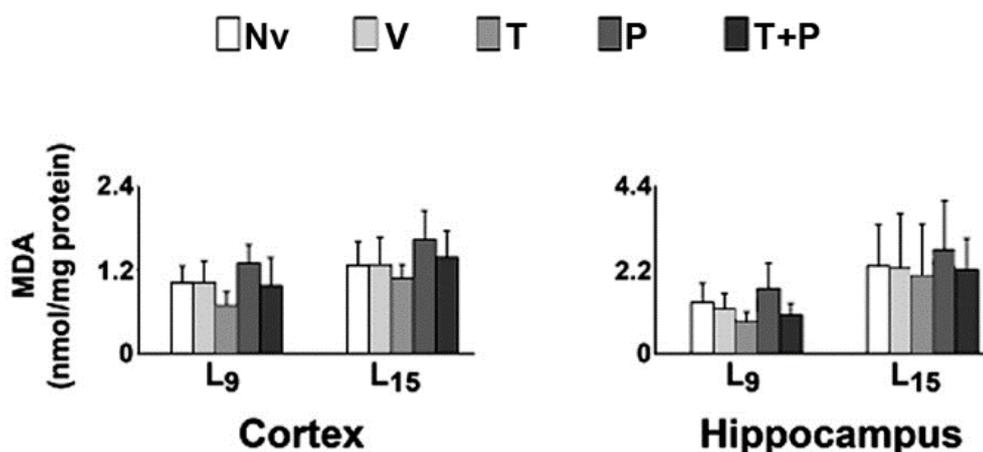


Figura 17. Níveis de MDA (nmol/mg de proteína) de ratos entre 60-65 dias de vida, submetidos a ambas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo (Nv) = nenhum tratamento; veículo (V) = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina (T) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina (P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina (T+P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ em comparação com grupos correspondentes na condição L₉ (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

6.2.6 Imunohistoquímica para micróglia e astrócito

O efeito da administração de taurina e / ou pilocarpina sobre a porcentagem de área marcada e imunoreatividade de células de astrócitos e microglia no córtex parietal e no hipocampo CA1 é mostrado nas Figuras 7 e 8 para Iba1 e 9 e 10 para GFAP. Todos os dados são descritos como média \pm desvio padrão de três a quatro animais.

6.2.6.1 Imunohistoquímica para Iba-1

Os dados de imunohistoquímica para Iba-1 estão apresentados na figuras 7 e 8. No córtex cerebral, ANOVA mostrou um efeito principal da condição de lactação em todos os grupos para percentual de área marcada [$F(1,371) = 5,074$; $p < 0,001$], e o pós-tesye (Holm–Sidak) mostrou que os animais da condição L₁₅ tiveram maior percentagem de área marcada quando comparados ao seus L₉ correspondentes. ANOVA também detectou um efeito do tratamento [$F(4,371) = 23,681$; $p < 0,001$], e o pós-teste revelou que o tratamento com taurina aumentou a percentagem de área marcada comparado aos outros quatro grupos do presente estudo. Por outro lado, na condição L₉, o grupo tratado com taurina+pilocarpina apresentou menor percentagem de area quando comparado com os grupos ingênuo, veículo e pilocarpina. Com relação a imunorreatividade para Iba-1 no *córtex cerebral*, ANOVA indicou um efeito da lactação [$F(1,355) = 59,454$; $p < 0,001$], e a comparação pós-teste mostrou que os animais da condição L₁₅ tiveram maior imunorreatividade quando comparados ao L₀ correspondente, exceto para o grupo tratado com taurina. ANOVA também revelou interação entre o tratamento e o estado nutricional, em que os grupos pilocarpina e taurina+pilocarpina L₁₅, mas não na condição L₉, tiveram maior imunorretividade comparado aos outros quatro grupos [$F(4,355) = 5,954$; $p < 0,001$].

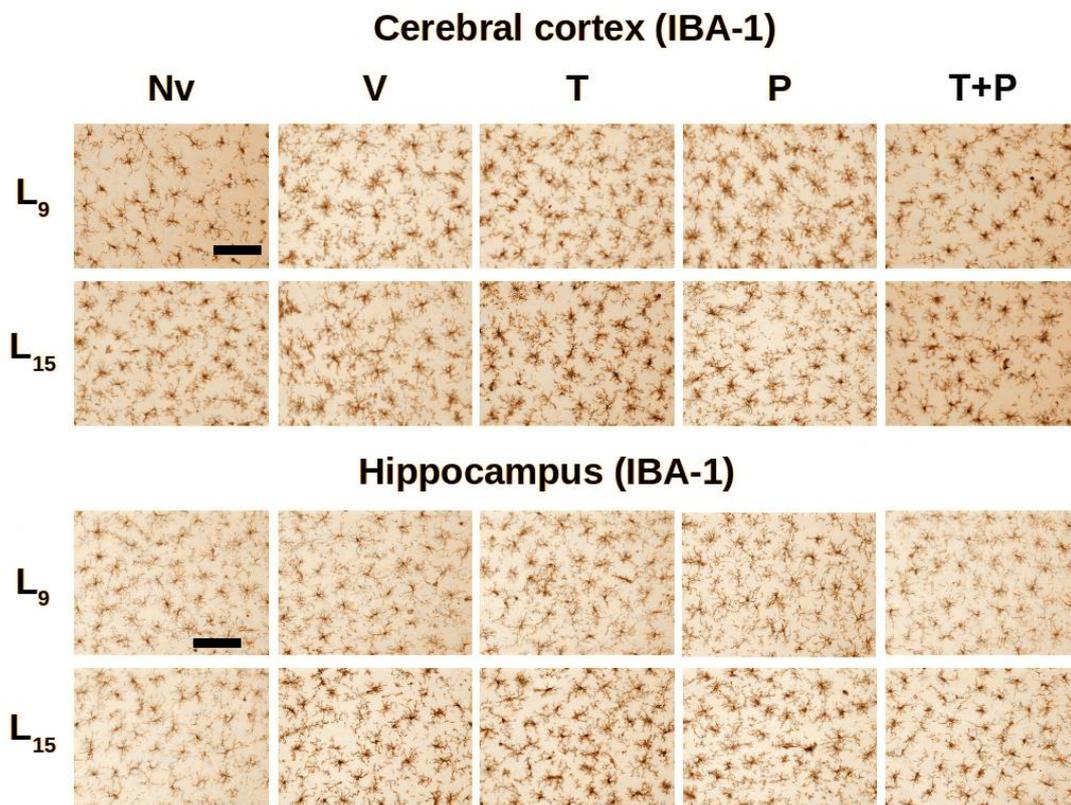


Figure 18. Fotomicrografias de células imunomarcadas para Iba1 no córtex e hipocampo de ratos entre 60-65 dias de vida, submetidos a ambas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo (Nv) = nenhum tratamento; veículo (V) = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina (T) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina (P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina (T+P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Barra de escala = 50 µm.

No *hipocampo*, ANOVA revelou um efeito principal da condição de lactação sobre a porcentagem de área marcada para Iba-1 [$F(1,376) = 64,536$; $p < 0,001$]; a comparação pós-teste (Holm–Sidak) mostrou que os grupos ingênuo, veículo, taurina e pilocarpina na condição L₁₅ tiveram maior porcentagem de área marcada quando comparado ao seu correspondente da condição L₉. ANOVA revelou um efeito principal do tratamento [$F(4,376) = 65,946$; $p < 0,001$], e o pós-teste detectou que nas duas condições de lactação o tratamento com taurina aumentou a porcentagem de área marcada para Iba-1 comparado aos outros quatro grupos.

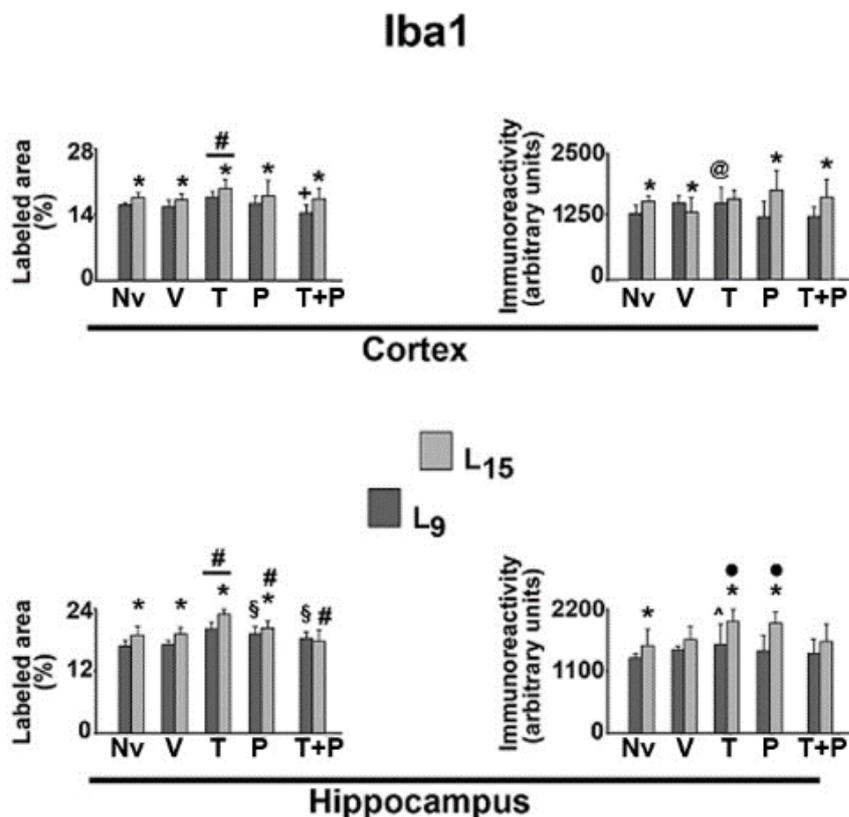


Figure 19. Percentual de área marcada (esquerda do painel) e imunorreatividade em unidades arbitrárias (direita do painel) de células imunomarcadas para Iba1 no cortex (superior do painel) e hipocampo (inferior do painel) de ratos entre 60-65 dias de vida, submetidos a ambas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo (Nv) = nenhum tratamento; veículo (V) = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina (T) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina (P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina (T+P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Dados são expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com grupos correspondentes na condição L₉. § $p < 0,001$ comparado aos grupos Nv e V de mesma condição de lactação. # $p < 0,001$ comparado aos outros quatro grupos de mesma condição de lactação. + $p < 0,001$ comparado aos grupos Nv, V e P de mesma condição de lactação. • $p < 0,001$ comparado aos grupos Nv, V e T+P de mesma condição de lactação. @ $p < 0,001$ comparado aos grupos P e T+P de mesma condição de lactação. ^ $p < 0,001$ comparado ao grupo Nv de mesma condição de lactação. (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

Adicionalmente, na condição L₉ os tratamentos pilocarpina e taurina+pilocarpina resultaram em maior percentagem de área marcada quando comparados com os grupos ingênuo e veículo de mesma condição de lactação. Na condição L₁₅, o grupo pilocarpina exibiu uma percentagem de área marcada maior que os grupos ingênuo, veículo e taurina+pilocarpina, mas foi menor que o grupo taurina; o grupo taurina+pilocarpina L₁₅ apresentou a menor percentagem de área marcada de Iba1. ANOVA também revelou interação entre estado nutricional e tratamento [$F(4,376) = 11,742$; $p < 0,001$], em que o grupo taurina teve maior percentagem de área cortical marcada para Iba-1 comparada aos outros quatro grupos. Com relação a imunorreatividade para Iba-1 no hipocampo, ANOVA indicou um efeito principal da condição de lactação [$F(1,350) = 59,217$; $p < 0,001$], e a comparação pós-teste mostrou que os animais dos grupos ingênuo, taurina e pilocarpina da condição L₁₅ tiveram maior imunorreatividade quando comparados aos correspondentes L₉. ANOVA revelou um efeito principal do tratamento [$F(4,350) = 14,626$; $p < 0,001$], e o pós-teste mostrou uma maior imunorreatividade na condição L₉ para os animais tratados com taurina quando comparados ao seu correspondente ingênuo. Entre os animais L₁₅, os grupos tratados com taurina e pilocarpina apresentaram maior imunorreatividade para Iba1 comparado aos grupos ingênuo, veículo e taurina+pilocarpina. ANOVA também observou interação entre estado nutricional e tratamento, em que os grupos taurina e pilocarpina L₁₅ tiveram maior

imunorreatividade comparado aos outros grupos da condição L₁₅ [$F(4,350) = 4,545$; $p < 0,001$].

6.2.7 Imunohistoquímica para GFAP

Os dados de imunohistoquímica para GFAP estão nas figuras 9 e 10. ANOVA mostrou um efeito da condição de lactação sobre a porcentagem de área marcada para GFAP no cortex cerebral [$F(1,434) = 63,276$; $p < 0,001$], e a comparação pós-teste (Holm–Sidak) mostrou que os grupos ingênuo, veículo e pilocarpina de condição L₁₅ tiveram menor porcentagem de área marcada quando comparados aos seus respectivos L₉. ANOVA também indicou um efeito principal do tratamento [$F(4,434) = 6,988$; $p < 0,001$], e o pós-teste revelou que na condição L₉ o tratamento com taurina+pilocarpina diminui a porcentagem de área marcada comparado aos grupos ingênuo, veículo e pilocarpina, e na condição L₁₅ o tratamento com taurina resultou em menor porcentagem de área marcada comparado aos outros quatro grupos da condição L₁₅. ANOVA também revelou interação entre estado nutricional e tratamento [$F(4,434) = 5,744$; $p < 0,001$], em que o grupo taurina L₁₅ teve uma menor porcentagem de área marcada em comparação aos outros grupos L₁₅.

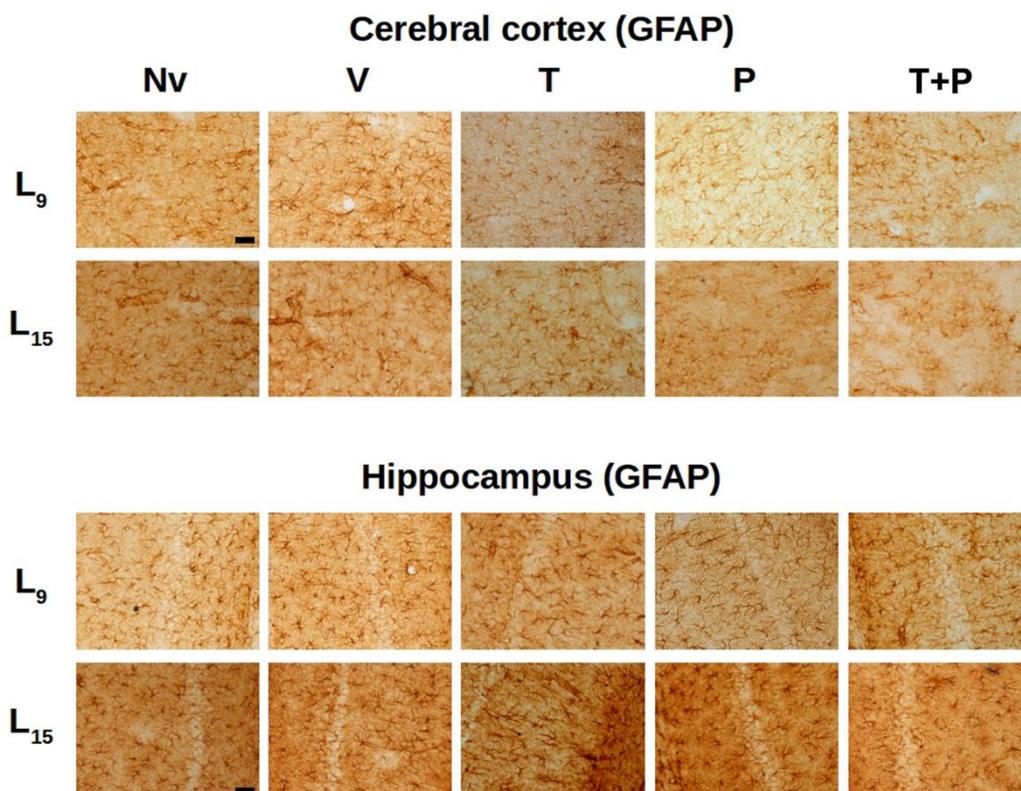


Figure 20. Fotomicrografias de células imunomarcadas para GFAP no córtex e hipocampo de ratos entre 60-65 dias de vida, submetidos a ambas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo (Nv) = nenhum tratamento; veículo (V) = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina (T) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina (P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina (T+P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Barra de escala = 50 µm.

Em relação a quantificação da imunorreatividade para GFAP no cortex cerebral, na condição L₉ ANOVA revelou um efeito principal do tratamento [$F(4,434) = 6,147$; $p < 0,001$], e o pós-teste mostrou maior imunorreatividade nos grupos tratados com taurina, pilocarpina e taurina+pilocarpina quando comparados aos grupos controle ingênuo e veículo. Entre os grupos L₁₅, os animais taurina apresentaram menor imunorreatividade comparado aos outros quatro grupos. ANOVA também demonstrou interação entre o estado nutricional e o tratamento em que o grupo taurina L₁₅ teve menor imunorreatividade comparado ao correspondente ingênuo e veículo, e também com o grupo taurina L₉ [$F(4,434) = 10,551$; $p < 0,001$].

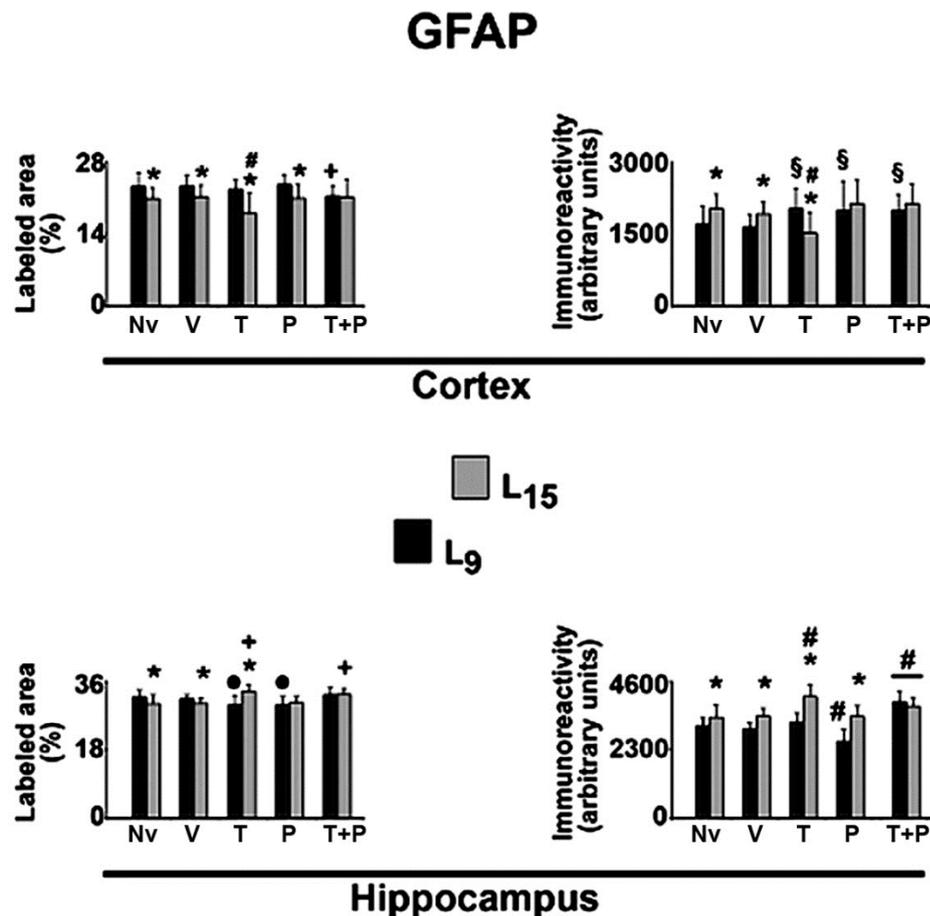


Figure 21. Percentual de área marcada (esquerda do painel) e imunorreatividade em unidades arbitrárias (direita do painel) de células imunomarcadas para GFAP no cortex (superior do painel) e hipocampo (inferior do painel) de ratos entre 60-65 dias de vida, submetidos a ambas condições de lactação L₉ e L₁₅ (ninhadas com 9 e 15 filhotes, respectivamente). Os grupos são: Ingênuo (Nv) = nenhum tratamento; veículo (V) = metil nitrato de escopolamina, 1 mg/kg/dia + salina; Taurina (T) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 300 mg/kg/dia de taurina; Pilocarpina (P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + salina; Taurina+pilocarpina (T+P) = metil nitrato de escopolamina 1 mg/kg/dia + 45 mg/kg/dia de pilocarpina + 300 mg/kg/dia de taurina + salina. A administração de veículo, taurina e/ou pilocarpina ocorreu do PND35 ao PND55. Dados são expressos como média ± desvio padrão. * $p < 0,001$ em comparação com grupos correspondentes na condição L₉. § $p < 0,001$ comparado aos grupos Nv e V de mesma condição de lactação. # $p < 0,001$ comparado aos outros quatro grupos de mesma condição de lactação. + $p < 0,001$ comparado aos grupos Nv, V e P de mesma condição de lactação. • $p < 0,001$ comparado aos grupos Nv, V e T+P de mesma condição de lactação. (ANOVA seguida pelo teste de Holm-Sidak).

Com relação às células imunomarcadas para GFAP no hipocampo, na condição L₉ ANOVA mostrou um efeito principal do tratamento [$F(4,401) = 14,819$; $p < 0,001$], e o pós-teste revelou que os tratamentos com taurina e pilocarpina diminuíram a percentagem de área marcada comparado aos grupos ingênuo, veículo e taurina+pilocarpina. Na condição L₁₅, os tratamentos com taurina e taurina+pilocarpina resultaram em maior percentagem de área marcada quando comparada aos grupos ingênuo, veículo e pilocarpina. ANOVA também revelou interação entre estado nutricional e tratamento [$F(4,401) = 15,918$; $p < 0,001$], em que o tratamento com taurina resultou em maior percentagem de área nos L₁₅, mas não nos L₉. Com relação à imunorreatividade para GFAP no hipocampo, ANOVA detectou um efeito principal da condição de lactação [$F(1,359) = 107,184$; $p < 0,001$], e a comparação pós-teste mostrou que os grupos ingênuo, veículo, e taurina na condição L₁₅ tiveram maior imunorreatividade quando comparados aos L₉ correspondentes. ANOVA detectou um efeito do tratamento [$F(4,359) = 53,366$; $p < 0,001$], e o pós-teste mostrou um menor imunorreatividade no grupo pilocarpina L₉ comparado aos outros grupos de mesma condição de lactação. Na condição L₁₅ condition, os animais tratados com taurina apresentaram maior imunorreatividade comparado aos outros quatro grupos da condição L₁₅. Em ambas as condições de lactação o tratamento com taurina+pilocarpina resultou em maior imunorreatividade comparado aos outros grupos de mesma condição nutricional. ANOVA também detectou interação entre o estado nutricional e tratamento, em que na condição L₁₅ o grupo taurine teve maior imunorreatividade comparado ao correspondente L₉ [$F(4,359) = 21,074$; $p < 0,001$].

7 DISCUSSÃO

Os dados apresentados demonstram que a administração por 21 dias de uma dose subconvulsivante de pilocarpina reduz a glicemia, promove o comportamento semelhante à ansiedade e desacelera a DAC independente do estado nutricional. Em algumas medidas (ver resultados), os dados também sugerem uma interação entre a condição de lactação e o tratamento com pilocarpina, indicando que o efeito da pilocarpina é mais evidente na condição de deficiência nutricional (L₁₅) e que para a maioria dos parâmetros analisados a associação com taurina não foi capaz de atenuar os efeitos induzidos pela pilocarpina. Os dados sobre ganho de peso, glicemia de jejum e comportamento usando uma dose de pilocarpina relativamente baixa (45 mg/kg/d) e sua interação com taurina constituem uma evidência experimental nova, enquanto os dados de pilocarpina e taurina, administradas de forma isolada, sobre DAC confirmam estudo prévio (GUEDES; VASCONCELOS, 2008; FRANCISCO; GUEDES, 2015). O estresse do procedimento de tratamento não pode ser a causa da alteração relatada porque os grupos veículo (V-L₉ e V-L₁₅) que receberam injeção intraperitoneal e gavagem (solução salina e escopolamina) apresentaram valores semelhantes aos controles ingênuo (Nv-L₉ e Nv-L₁₅). Os resultados enfatizam a eficácia da pilocarpina e da taurina na modificação do funcionamento comportamental e eletrofisiológico do cérebro.

A diferença de peso corporal entre as condições de lactação L₉ e L₁₅ confirmam evidências anteriores sobre a eficácia do aumento do tamanho da ninhada na produção de deficiência nutricional (FRANCISCO; GUEDES, 2015; LIMA et al., 2017). Isto está de acordo com evidências de outros indicando que a diminuição do peso corporal reflete a redução de peso no cérebro e outros órgãos importantes, que geralmente é acompanhada por alterações na função dos órgãos (MORGANE et al., 1978; 1993; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Além disso, a redução nos níveis de glicose no sangue nos grupos L₁₅, em comparação com os grupos L₉ correspondentes, suporta esta conclusão.

Em relação à ação da pilocarpina, trabalhos anteriores relataram comprometimento no crescimento e desenvolvimento, bem como níveis elevados de glicose no sangue em filhotes de mães epiléticas tratadas com pilocarpina (COSSA et al., 2016). No presente trabalho, o tratamento com pilocarpina prejudicou o peso

corporal e encefálico dos filhotes (Figuras 8 e 12) e seus níveis de glicose no sangue (Figuras 9 e 13). A administração de taurina atenuou a ação da pilocarpina. No entanto, esse papel, sobre o peso corporal, foi evidenciado apenas para a condição L₉- na idade P49. Embora os dados de peso corporal e encefálico sejam coerentes, diferenças nos níveis de glicose no sangue podem ser atribuídas a paradigmas distintos de tratamento com pilocarpina: administração de doses convulsivantes às mães (COSSA et al., 2016) *versus* tratamento dos filhotes com doses subconvulsivantes (trabalho atual).

Os dados obtidos nos testes comportamentais CA e LCE (Figura 10 e 14) são coerentes com trabalhos publicados anteriormente (FRANCISCO; GUEDES, 2015; LIMA et al., 2017; ACCIOLY; GUEDES, 2017). O tratamento com dose subconvulsivante de pilocarpina foi associado a um comportamento mais ansioso do que o observado nos animais controles (Figuras 10 e 14). Como dado relevante, mencionamos que o sistema colinérgico está implicado na regulação emocional (HOELLER et al., 2016). Ambas as doses, subconvulsivas (DUARTE et al., 2010; 2013; HOELLER et al., 2016) e convulsivas de pilocarpina (LEITE et al., 2016) podem induzir respostas ansiogênicas de curta duração e de longa duração em ratos. A administração de taurina foi associada a um comportamento menos ansioso quando comparado ao de ratos controle e tratados com pilocarpina, corroborando achados de trabalhos prévios (MURAKAMI e FURUSE, 2010; FRANCISCO; GUEDES, 2015). A sua associação com pilocarpina (trabalho atual) parece não influenciar a ação desse convulsivante sobre parâmetros comportamentais.

Nas últimas três décadas, o LAFINNT caracterizou muito bem o efeito acelerador da deficiência nutricional sobre a DAC (GUEDES et al., 1987; ROCHA-DE-MELO et al., 2006; GUEDES, 2011; FRANCISCO; GUEDES, 2015; lima et al., 2017; ACCIOLY; GUEDES, 2017). Os dados presentes (Figuras 11 e 15) confirmam tal efeito, cujos mecanismos subjacentes ainda são objeto de investigação. Alguns mecanismos altamente consolidados na literatura podem ser citados: a) redução da mielinização cerebral (DE LUCA; CIOFFI; BUREŠ, 1977; ROCHA-DE-MELO et al., 2006); b) dano da função glial (MORGANE et al., 1978); c) maior volume do espaço extracelular no cérebro (MAZEL et al., 2002); d) redução da captação de glutamato no cérebro (FEOLI et al., 2006); e) aumento dos níveis da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (DÍAZ-CINTRA et al., 2007); f) aumento da densidade de empacotamento celular e redução do espaço extracelular e menor grau de

mielinização cortical (MERKLER et al., 2009). Tomadas em conjunto, as evidências citadas acima permitem explicar a ação facilitadora da desnutrição sobre o fenômeno da DAC.

Este trabalho demonstra a ação da pilocarpina administrada de forma crônica sobre a DAC, em condições de lactação distintas. Em comparação ao protocolo de pilocarpina usualmente descrito na literatura para provocar convulsão em roedores (300 - 380 mg/kg), a dose subconvulsivante de pilocarpina utilizada no presente trabalho (45 mg/kg) representa, em média, 12 a 15% da dose convulsiva. Nessa dose tão baixa, não foram detectados sinais comportamentais de epilepsia nos animais estudados. No entanto, embora subconvulsivante, a presente dose de pilocarpina foi eficaz em desacelerar a propagação da DAC, avaliada pela alteração de seus parâmetros (menor velocidade de propagação, menor amplitude e maior duração das ondas) em comparação com os controles. A pilocarpina desloca o equilíbrio entre os mecanismos neurais excitatórios e inibitórios para um estado de hiperexcitabilidade (MORIMOTO et al., 2004; L'AMOREAUX et al., 2010), o que dificulta a elicitação e a propagação da DAC (GUEDES; CAVALHEIRO, 1997). Com relação aos prováveis mecanismos bioquímicos subjacentes ao comprometimento da DAC que está associado ao tratamento com pilocarpina, uma possibilidade seria baseada na adaptação metabólica que aumenta a eficiência cerebral para remover o potássio extracelular sob condições de hiperexcitabilidade (HEINEMANN; LUX, 1975; KOROLEVA e BUREŠ, 1980). Por outro lado, os mecanismos de desinibição de interneurônios GABAérgicos também poderiam participar na geração de hiperexcitabilidade (MCMAHON; KAUER, 1997) e sobre a DAC, como sugerido recentemente (SILVA-GONDIM et al., 2017).

Em relação ao equilíbrio redox no cérebro, dados anteriores sugerem que a DAC pode induzir estresse oxidativo (SHATILLO et al., 2013; VIGGIANO et al., 2011). Na outra direção, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio no sistema nervoso pode desencadear o fenômeno da DAC (EL-BACHÁ et al., 1998; MALKOV et al., 2014; NETTO; MARTINS-FERREIRA, 1989). Curiosamente, vários agentes antioxidantes têm demonstrado um papel desacelerador sobre a DAC (ABADIE-GUEDES et al., 2012; 2016; LOPES-DE-MORAIS et al., 2014). Em conjunto, essas evidências podem explicar a ação de desaceleração da taurina sobre a DAC, uma vez que a taurina é considerada uma molécula com propriedades antioxidantes (JAFRI et al., 2019; EL-MARAGHI et al., 2018; LEÃO et al., 2018; OMMATI et al., 2018).

Nossos dados reforçam uma recente sugestão de que, em uma condição de desequilíbrio de excitabilidade, a taurina desempenha um papel inibitório e neuroprotetor (HRNČIĆ et al., 2018). Como uma estrutura molecular que é muito semelhante ao neurotransmissor GABA, a taurina afeta a abertura dos canais de cloreto, preferencialmente por interações com os receptores GABAA e com menor afinidade com os receptores glicina e GABAB no cérebro adulto (OJA; SARANSAARI, 2013; HRNČIĆ et al., 2018). Curiosamente, o desequilíbrio extracelular de cloreto tem mostrado afetar a propagação da CSD in vitro na retina isolada (MARTINS-FERREIRA et al., 1974) e in vivo no córtex de coelhos (GUEDES; DO CARMO, 1980).

As convulsões induzidas por pilocarpina estão correlacionadas com a produção elevada de espécies reativas de oxigênio e por alterações no nível de aminoácidos cerebrais, com aumento do conteúdo de glutamato e diminuição dos níveis de taurina no hipocampo de ratos (SANTOS et al., 2011). Por outro lado, o tratamento crônico com uma dose subconvulsiva de pilocarpina (45 mg / kg / dia) não aumentou os níveis de MDA no tecido cerebral (MENDES-DA-SILVA et al., 2018), sugerindo que nessas condições o estresse oxidativo não aumenta, e os dados atuais reforçam essa sugestão. Em conjunto, os resultados apóiam a hipótese de que, após a administração de pilocarpina, os níveis cerebrais de MDA aumentam apenas se a pilocarpina induzir convulsões convulsivas (MCELROY et al., 2017; CARMONA-APARICIO et al., 2016; FREITAS et al., 2010; HAMED; ABDELLAH, 2004).

Neste estudo, a sucção desfavorável (em grandes ninhadas) aumentou a ativação da microglia no córtex e no hipocampo, além dos efeitos comportamentais (ansiedade) e eletrofisiológicos (DAC), corroborando com estudos anteriores do nosso grupo (VIANA et al. 2013; LIMA et al., 2017). Além disso, de acordo com os efeitos da taurina na lesão cerebral traumática (SU et al., 2014), nosso tratamento com taurina diminuiu a imunorreatividade glial no córtex e no hipocampo. Curiosamente, tanto o córtex quanto o hipocampo são regiões afetadas patologicamente na epilepsia do lobo temporal humano (DAS et al., 2009; GONÇALVES PEREIRA et al., 2005), na patogênese da qual a ativação de astrócitos e microgliais é um elo importante (CLASADONTE et al., 2016; ZHAO et al., 2018).

As células de Microglia podem ser ativadas, não apenas pela degeneração neuronal retardada, mas pela hiperatividade neuronal, que precede o fim neuronal (EYO et al., 2017). É interessante observar que a imunomarcação de Iba1 também rotula macrófagos, que podem se infiltrar no SNC; portanto, não   um marcador

específico para a microglia e pode se envolver em respostas inflamatórias no cérebro, bem como respostas comportamentais (WOHLEB et al. 2015).

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem um efeito cerebral da taurina em ratos tratados com pilocarpina, os quais são expressos no peso corporal, glicemia, parâmetros comportamentais (ansiedade), eletrofisiológicos relacionados com a DAC e alterações microgliais. Para alguns desses parâmetros, os dados sugerem interação taurina / pilocarpina / desnutrição, cujos mecanismos merecem maior exploração.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados *in vivo* da presente tese nos permitem as seguintes conclusões:

- Os pesos corporais e encefálicos reduzidos, observados na condição de lactação desfavorável, corroboram outros estudos, confirmando a eficácia do modelo experimental utilizado para induzir deficiência nutricional.
- A taurina provocou comportamento do tipo ansiolítico, corroborando estudos prévios do nosso grupo
- A administração de dose subconvulsivante de pilocarpina induziu comportamento do tipo ansioso, assim como descrito na literatura, e a condição de lactação L₁₅ parece intensificar esses efeitos.
- A glicemia de jejum foi afetada pela condição nutricional, corroborando trabalhos prévios do nosso grupo.
- A condição desfavorável de lactação acelera a propagação da DAC, confirmando trabalhos prévios.
- O tratamento crônico com taurina e/ou pilocarpina torna o tecido cortical mais resistente à propagação do fenômeno da DAC.
- A lactação desfavorável aumenta a amplitude e diminui a duração da mudança negativa lenta do potencial da DAC.
- O tratamento crônico com dose subconvulsivante de pilocarpina (45/mg/kg/21dias) diminui a amplitude e duração da mudança negativa lenta do potencial da DAC apenas em animais desnutridos.

- A passagem da DAC aumenta a amplitude do ECoG em condições normais e desfavoráveis de lactação. No entanto, a lactação desfavorável diminui o aumento dessa amplitude.
- O tratamento crônico com pilocarpina e/ou taurina diminui a amplitude do ECoG no ponto mais próximo a deflagração da DAC.
- A condição desfavorável de lactação diminui a amplitude do ECoG no ponto mais próximo a deflagração da DAC em animais tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina.
- Em ratos jovens, a condição desfavorável de lactação, induzida pelo aumento da quantidade de filhotes por ninhada, intensifica os efeitos do aminoácido taurina e da pilocarpina sobre a DAC.
- O tratamento crônico com taurina (300 mg/kg/21dias) e/ou pilocarpina (45 mg/kg/21dias) não influencia de forma significativa os níveis de MDA no córtex e hipocampo.
- O aleitamento desfavorável (em grandes ninhadas) aumenta a ativação da microglia no córtex e no hipocampo

9.1 PERSPECTIVAS

Almejando dar continuidade a este trabalho, sugere-se como perspectivas, caracterizar:

- Os efeitos da administração de pilocarpina e/ou taurina em diferentes modelos de desnutrição.
- A relação entre doses diferentes de taurina e/ou pilocarpina, e seus efeitos sobre os parâmetros estudados nesta tese (“curva dose-resposta”)

- Os níveis cerebrais de taurina, glutamato e GABA em animais tratados com pilocarpina e/ou taurina, objetivando correlacioná-los com os efeitos eletrofisiológicos, comportamentais e bioquímicos descritos.
- Os efeitos da administração tópica cortical de pilocarpina e taurina a fim de observar sua ação cortical direta, sem os efeitos sistêmicos.

REFERÊNCIAS

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

ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R. DE S.; GUEDES, R. C. A. Alpha-Tocopherol Counteracts the Effect of Ethanol on Cortical Spreading Depression in Rats of Various Ages, With and Without Ethanol Abstinence. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 40, n. 4, p. 728–33, abr. 2016.

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

ACCIOLY, N.E.; GUEDES, R.C.A. Neonatal treatment with ovarian hormones and suckling among distinct litter sizes: differential effects on recognition memory and spreading depression at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 19, p. 1-11. 2017

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

AGOSTONI, C. et al. Free glutamate and glutamic acid increase in human milk through a three-month lactation period. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 31 n. 5, p. 508-12, 2000.

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. 1463-80, 2012.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, p. 275-82, 2006.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 70-5, 2013.

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

BARBEAU, A. et al. The neuropharmacology of taurine. **Life Sciences**, v.17, n. 5, p. 669-77, 1975.

BARKER-HALISKI, M.; WHITE, H. S. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 8, p. a022863, 22 jun. 2015.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M. et al. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 452-7, 2012.

BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. Transição Nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 181-91, 2003.

BAULAC, M.; PITKÄNEN, A. Research priorities in epilepsy for the next decade—a representative view of the European scientific community. **Epilepsia**, v.50, p.571-83, 2009.

BENTON, D. The influence of children's diet on their cognition and behavior. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 25-37, 2008.

BERGER, M. et al. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. **Cephalalgia**, v. 28, p.558–562, 2008.

BIRDSALL, T.C. Therapeutic applications of taurine. **Alternative Medicine Review**, v. 3, p. 128-36, 1998.

BORBA, J.M.C. et al. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 193–201, 2000.

BYMASTER, F.P. et al. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. **European Journal Neuroscience** v. 7, p. 1403-10, 2003.

CABRAL, F.R. et al. Malnutrition in infancy as a susceptibility factor for temporal lobe epilepsy in adulthood induced by the pilocarpine experimental model. **Dev Neurosci**, v. 33, p. 469–78, 2011.

CARLSON, A. P. et al. Vascular, electrophysiological, and metabolic consequences of cortical spreading depression in a mouse model of simulated neurosurgical conditions. **Neurology Research**, v. 34, n. 3, p. 223–31, 2012.

CARLSON, A.P. et al. Cortical spreading depression occurs during elective neurosurgical procedures. **Journal of Neurosurgery**, v. 11, p. 1–8, 2016.

CLASADONTE, J. et al. Molecular analysis of acute and chronic reactive astrocytes in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Neurobiol. Dis.** 91, 315-325, 2016.

COSSA, A.C. et al. Maternal seizures can affect the brain developing of offspring. **Metab. Brain Dis.** 31, 891-900, 2016.

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. 271-5, 2006.

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. 177-80, 2001.

CRUNELLI, V., CARMIGNOTO, G., STEINHÄUSER, C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. **Neuroscientist**. 21, 62-83, 2015

DAWSON, R.JR. et al. Effects of high salt diets and taurine on the development of hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Amino Acids**, v. 19, p. 643-55, 2000.

Das, S.R. et al. Structure specific analysis of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. **Hippocampus** 19, 517–525, 2009.

DE LUCA, B.; CIOFFI, L.A.; BUREŠ, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Act Nerv Sup**, v. 19, p. 130-1, 1977.

DÍAZ-CINTRA, S. et al. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1–3 subfields of the dorsal hippocampus. **Exp Neurol**, v. 208, p. 47-53, 2007.

DOGRU-ABBASOGLU, S. et al. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 23-7, jan. 2001.

DREIER, J.P. et al. Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. **Brain**, v. 135, n. 1, p. 259–75, 2012.

Duarte, F.S. et al. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology** 227, 209–219, 2013.

Duarte, F.S. et al. Short- and long-term anxiogenic effects induced by a single injection of subconvulsant doses of pilocarpine in rats: investigation of the putative role of hippocampal pathways. **Psychopharmacology** 212, 653–661, 2010.

EL IDRISSE, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. **Amino. Acids**. v. 34, n. 2, p. 321-8, 2008.

EL-MARAGHI, E.F. et al. Taurine provides a time-dependent amelioration of the brain damage induced by γ -irradiation in rats. **J. Hazard Mater** 359, 40-46, 2018.

ENGER, R. et al, 2015. Dynamics of Ionic Shifts in Cortical Spreading Depression. **Cerebral Cortex**, v. 25, p. 4469–76, 2015.

ENGLLOT, D.J.; CHANG, E.E. Rates and predictors of seizure freedom I respective epilepsy surgery: an update. **Neurosurgical Review**, v. 37, p. 389-405, 2014.

ERICSON, M. et al. Taurine elevates dopamine levels in the rat nucleus accumbens; antagonism by strychnine. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 3225-9, 2006.

ESPINOSA-JOVEL, C. et al. Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. **Seizure**, v. 56, p. 67-72, 2018.

EYO, U.B.; MURUGAN, M.; WU, L.J. Microglia-neuron communication in epilepsy. **Glia**, v 65, n. 1, p. 5-18, 2017.

FABRICIUS M. et al. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. **Clin Neurophysiol**, v. 119, p. 1973–84, 2008.

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

FEOLI, A.M. et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition**, v. 22, p. 160-5, 2006.

FERRARI, M.D. et al. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. **Lancet Neurol**, v. 14, p. 65-80, 2015.

FISHER, R. S. et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–2, abr. 2005.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, abr. 2014.

FLORIAN, M.L.; NUNES, M.L. Effects of intra-uterine and early extra-uterine malnutrition on seizure threshold and hippocampal morphometry of pup rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, p. 151-8, 2011.

FOOTITT, D.R.; NEWBERRY, N.R. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. **Brain Research**, p. 339-42, 1998.

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.

GERMANO, P.C.S. et al. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 275-81, 2013.

GIL-MONTOYA, J.A. et al. Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: a systematic review. **Med Oral Patol Cir Bucal**, v. 21, n. 3, p. 355-66, 2016.

GORJI, A., SPECKMANN, E. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. **European Journal Neuroscience**, v. 19, p. 3371-4, 2004.

GREEN, T.R.; FELLMAN, J.H.; EICHER, A.L.; PRATT, K.L. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1073, n. 1, p. 91-7, 1995.

GUEDES, R. C.; FRADE, S. F. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 11, p. 1241–4, nov. 1993.

GUEDES, R.C.A Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin (eds.), **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**, Springer, London, p. 2343-55, 2011.

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

GUEDES, R.C.A. et al. 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., CAVALHEIRO, E.A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Res.** 27, 33-40, 1997.

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. **Neurosci. Lett.** 442, 118–122, 2008.

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 20, 639-642, 1987.

GUEDES, R.C.A. et al. Evidence of an inverse correlation between serotonergic activity and spreading depression propagation in the cortex. **Brain Res.** 1672, 29-34, 2017.

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. 1407-12, 1996.

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.; 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.; DO CARMO, R.J. Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental Brain Research**, v. 39, n. 3, p. 341-9, 1980.

GUEDES, R.C.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M.S. Effect of pre and postnatal propylthiouracil administration on propagation cortical spreading depression of adults rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 1123-8, 1993.

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. 118-22, 2008.

GUEDES, R.C.A.; TSURUDOME, K.; MATSUMOTO, N. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v. 1036, p.109-14, 2005.

HACKETT, R.; IYPE, T. Malnutrition and childhood epilepsy in developing countries. **Seizure-European Journal of Epilepsy**, v. 10, p. 554-8, 2001.

HAMED, S.A., ABDELLAH, M.M. Trace elements and electrolytes homeostasis and their relation to antioxidant enzyme activity in brain hyperexcitability of epileptic patients. **J. Pharmacol. Sci.** 96, 349–359, 2004.

HRNČIĆ, D. et al. Sulfur-containing amino acids in seizures: current state of the art. **Curr. Med. Chem.** 25, 378-390, 2018

HAMILTON, S.E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 13311–6, 1997.

HANSEN, A.J.; OLSEN, C.E. Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 108, n. 4, p. 355-65, 1980.

HEINEMANN, U.; LUX, H.D., Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. **Brain Research**, v. 93, p. 63-76, 1975.

HERNANDES, A.S. et al. Effects of different malnutrition techniques on the behaviour of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 240-5, 2005.

HOELLER, A.A. ET AL. The Role of hippocampal NMDA Receptors in Long-Term Emotional Responses following Muscarinic Receptor Activation. **PLoS One** 11, 2016.

HOLMES GL; ZHAO Q. Choosing the correct antiepileptic drugs: from animal studies to the clinic. **Pediatric Neurol**, v. 12, p.151-62, 2008.

HUXTABLE R. J. The physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**, v. 72 n. 1, p. 101-63, 1992.

IQBAL, M. et al. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of different exercise programs in pilocarpine induced status epilepticus models. **Epilepsy & Behavior**, v. 73, p. 256-67, 2017.

IZQUIERDO, I. et al. 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. 115-27, 2008.

JACKSON, M.J., TURKINGTON, D. Depression and anxiety in epilepsy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**. 76, 45-47, 2005.

JIA, F. et al. Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA_A receptors in the thalamus. **Journal of Neuroscience**, v.28, n. 1, p. 106-15, 2008.

JIANG, Z. et al. Taurine activates strychnine-sensitive glycine receptors in neurons freshly isolated from nucleus accumbens of young rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, p. 248–57, 2004.

JOHNSTONE, V.P.; RAYMOND, C.R. A protein synthesis and nitric oxide-dependent presynaptic enhancement in persistent forms of long-term potentiation. **Learning & Memory**, v.18, p. 625-33, 2011.

KOROLEVA, V.I., BUREŠ, J. Blockade of cortical spreading depression in electrically and chemically stimulated areas of cerebral cortex in rats. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.** 48, 1-15, 1980.

KRAMER, D.R. et al. Cortical spreading depolarization: Pathophysiology, implications, and future directions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.24, p. 22-7, 2016.

L'AMOREAUX, W. J.; MARSILLO, A.; EL IDRISSE, A. Pharmacological characterization of GABA_A receptors in taurine-fed mice. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, p. 1-5, 2010.

LANDGRAVE-GÓMEZ, J., et al. Anticonvulsant effect of time-restricted feeding in a pilocarpine-induced seizure model: metabolic and epigenetic implications. **Front. Cell. Neurosci.** 10, 7, 2016.

LANGMEAD, C. J.; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 232–43, 2008.

LAURITZEN, M. et al. 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.

LAURITZEN, M., STRONG, A.J. 'Spreading depression of Leão' and its emerging relevance to acute brain injury in humans. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 37, 1553-1570, 2016.

LEÃO, A.A.P. Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, p. 391-96, 1944b.

LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, p. 359–90, 1944a.

LEÃO, A.A.P. The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. **Journal of Neurophysiology**, v. 3, n. 3, p. 315-21, 1951.

LEÃO, V.F. et al. Taurine supplementation prevents endothelial dysfunction and attenuates structural changes in aortas from hypothalamic obese rats. **Eur. J. Nutr.** 2018.

LEE, D. A.; HIGGINBOTHAM, E. J. Glaucoma and its treatment: a review. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 7, p. 691–9, 1 abr. 2005.

LEITE, I.S., CASTELHANO, A.S.S., CYSNEIROS, R.M. Effect of diazepam on sociability of rats submitted to neonatal seizures. **Data in Brief.** 7, 686–691, 2016.

LEONOARDI, M.; USTUN, T.B. The global burden of epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p. 21-5, 2002.

LÉVESQUE, M.; AVOLI, M.; BERNARD, C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systematic chemoconvulsant administration. **Journal Neuroscience Methods**, 260, p. 45–52, 2016.

LIMA, C.B. et al. 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, D.S.C. et al. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v. 85, p. 241-7, 2009.

LIMA, D.S.C. et al. Neonatal L-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size-and large size litters. **Amino Acids**, v. 49, p. 337-46, 2017.

LIU, J. et al. Antenatal supplementation of taurine for protection of fetal rat brain with intrauterine growth restriction from injury by reducing neuronal apoptosis. **Neuropediatrics**, v. 43, p. 258-63, 2012.

LOPES-DE-MORAIS, A.A.C. et al. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Research**, v. 1591, p. 93-101, 2014.

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

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

MARRANNES, R. et al. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. **Brain Res.** 457, 226-240, 1988.

MAZEL T. et al. Changes in extracellular space volume and geometry induced by cortical spreading depression in immature and adult rats. **Physiol Res**, v. 51, p. 85–93, 2002.

MCMAHON, L.L., KAUER, J.A. Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity. **Neuron**. 18, 295–305, 1997.

MELANCON, B. J. et al. Allosteric modulation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: improving cognition and a potential treatment for schizophrenia and Alzheimer's disease. **Drug discovery today**, v. 18, n. 23–4, p. 1185–99, 2013.

MENDES-DA-SILVA, R.F. et al. 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. 155-60, 2014.

MENDES-DA-SILVA, R.S., FRANCISCO, E.S., GUEDES, R.C.A. Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: Electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. **Brain Res. Bull.** 142, 414-421, 2018.

MERKLER, D. et al. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. **Ann Neurol**, v. 66, p. 355-65, 2009.

MEYER, A.C. et al. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. **WHO Bulletin**, v. 88, p. 260-6, 2010.

MINJAREZ, B. et al. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 83, p. 373-80, 2017.

MOLCHANOVA, S.M.; OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus. **Proc West Pharmacology Society**, v. 50, p. 95-7, 2007.

MONTE-GUEDES, C.K.R. et al. Chronic treatment with ascorbic with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing wellnourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, p. 191-4, 2011.

MORGANE, P. J. et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.

MORGANE, P.J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

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. 471-83, 2002.

MORIOMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R.J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 73, p. 1-60, 2004.

MURAKAMI, T.; FURUSE, M. The impact of taurine - and beta-alanine-supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. **Amino Acids**, v. 39, p. 427-34, 2010.

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

NUNES, M,L. et al. Evaluation of the nutritional status in institutionalized children and its relationship to the development of epilepsy. **Nutritional Neuroscience**, v. 2, p. 139-45, 1999.

O'DELL, C.M. et al. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, p. 913-24, 2012.

OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Taurine and epilepsy. **Epilepsy Research**, p. S0920-1211, 2013.

OKAMOTO, K.; KIMURA, H.; SAKA, I. Y. Evidence for taurine as an inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: selective antagonism by TAG (6am inomethyl-3-methyl-4 H,1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide). **Brain Research** v. 265, p. 163-8, 1983.

OLIVEIRA, V. A. et al. Determinantes dos déficits ponderal e de crescimento linear de crianças menores de dois anos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 5, p. 874-82, 2006.

ONIS, M. et al. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO global database on child growth. **WHO Bulletin**, v. 71, p. 703-712, 1993.

PAN, C. et al. Protection of taurine and granulocyte colony-stimulating factor against excitotoxicity induced by glutamate in primary cortical neurons. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, (Suppl 1):S18, 2010.

PANULA-LEHTO E.; MÄKIEN, M.; AHTEE, L. Effects of taurine, homotaurine and

GABA on hypothalamic and striatal dopamine metabolism. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, v. 346, p. 57-62, 1992.

PEETERS, M., et al. Effects of pan- and subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on cortical spreading depression in the rat: Therapeutic potential for migraine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 321, 564-572, 2007.

PEIXINHO-PENA, L.F. et al. A strength exercise program in rats with epilepsy is protective against seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 25, n. 3, p. 323-8, 2012.

PETSAS, A.; CHAPMAN, G.; STEWART, R. Acute angle closure glaucoma – a potential blind spot in critical care. **J Intensive Care Soc**, v. 18, n. 3, p. 244-6, 2017.

PLATT, B.; RIEDEL, G. The cholinergic system, EEG and sleep. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 499–504, 2011.

PORTO, J.A. et al. 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.

PUSIC, D.A. et al. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental Neurology** v. 264, p. 43-54, 2015.

RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: motor seizure. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.** 32, 281–294, 1972.

RIPPS H.; SHEN, W. Review: Taurine: a “very essential” amino acid. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2673-86, 2012.

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

ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663-9, 1997.

ROYSOMMUTI, S.; WYSS, J.M. Perinatal taurine exposure affects adult arterial pressure control. **Amino Acids**, v. 46, n. 1, p. 57-72, 2014.

SANTOS, N.F. et al. Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. **Brain Research Reviews**, v. 32, p. 269–76, 2000.

SANTOS-MONTEIRO, J.S.; TEODÓSIO, N.R.T.; 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. 1, p. 29-40, 2000.

SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Taurine in neurotransmission. In: VIZI, E.S. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, v. 2, **Neurotransmitter Systems**, 3rd ed. **Springer**, New York, p. 325-42, 2008.

SCHELLER, D. et al. Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct. **Amino Acids**, v. 19, p. 571-83, 2000.

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

SHIH, K.C. et al. Systematic review of randomized controlled trials in the treatment of dry eye disease in Sjögren syndrome. **Journal of Inflammation**, v. 14, n. 26, 2017.

SILVA-GONDIM, M.B. et al. Suckling in litters with different sizes, and early and late swimming exercise differentially modulates anxiety-like behavior, memory and electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 29, p. 1-10, 2017.

SOARES, G. S. F. et al. 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. 307–15, out. 2015.

SONG, N.Y. et al. Interaction between taurine and GABAA/glycine receptors in neurons of the rat anteroventral cochlear nucleus. **Brain Research**, v. 1472, p. 1-10, 2012.

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

STAPLETON, P.P. et al. Review: Host defense-a role for the amino acid taurine? **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 42-8, 1998.

SUN, M. et al. Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. **Amino Acids**, v. 42, p. 1735-47, 2012.

SVED, D.W. et al. Absorption, tissue distribution, metabolism and elimination of taurine given orally to rats. **Amino Acids**, v. 32, p. 459-66, 2007.

SZCZUROWSKA, E., MAREŠ, P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol. Res.* 62, 21-38, 2013.

TAMAKI, R. et al. Spreading depression and focal venous cerebral ischemia enhance cortical neurogenesis. **Neural Regen Res**, v. 12, p. 1278-86, 2017.

TAMBER, M.S.; MOUNTZ, J.M. Advances in the diagnosis and treatment of epilepsy. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 42, n. 6, p. 371-86, 2012.

TARANUKHIN, A.G. et al. Taurine protects immature cerebellar granular neurons against acute alcohol administration. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 643, p. 159-67, 2009.

TARANUKHIN, A.G. et al. Taurine reduces caspase-8 and caspase-9 expression induced by ischemia in the mouse hypothalamic nuclei. **Amino Acids**, v. 34, p. 169-74, 2008.

TENÓRIO, 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. 431-7, 2009.

TOTTENE, A., et al. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca (v) 2.1 knockin migraine mice. **Neuron**. 61, 762-773, 2009.

TRACHTMAN, H. et al. Taurine ameliorates chronic streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 269, n. 3, p. 429-38, 1995.

TRINDADE-FILHO, E.M.; VASCONCELOS, C.A.; GUEDES, R.C.A. Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in RE sleep deprived and non-deprived adult rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, p. 235-41, 2009.

TURSKI, L. et al. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154–71, 1989.

VAN LIEFFERINGE, J. et al. Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. 139, p. 1-24, 2013.

VASCONCELOS, C.A. et al. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 163-70, 2004.

VINOGRADOVA, L.V. Initiation of spreading depression by synaptic and network hyperactivity: Insights into trigger mechanisms of migraine aura. **Cephalgia**, v. 1, 27 jul. 2017.

VITOR-DE-LIMA, S. M. et al. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. **Nutritional Neuroscience**, p. 1–9, 10 nov. 2017.

WATANABE, M. et al. New low-dose liquid pilocarpine formulation for treating dry mouth in Sjögren's syndrome: clinical efficacy, symptom relief, and improvement in quality of life. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Science**, v. 1, 2018.

WEI, Y.; ULLAH, G.; SCHIFF, S.J. Unification of neuronal spikes, seizures, and spreading depression. **Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 11733-43, 2014.

WOHLEB, E.S. et al. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. **Front Neurosci** 8:447, 2015.

WU, J.Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **Journal of Biomedical Science** 17(Suppl 1):S1, 2010.

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. 1277-81, 1991.

YAKIMOVA, K. et al. Effects of GABA agonists and antagonists on temperature-sensitive neurons in the rat hypothalamus. **Journal of Physiology**, v. 494, p.217-30, 1996.

YANG, Y.; CALAKOS, N. Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, v.5, p. 1-21, 2013.

YIN, Y.H.; AHMAD, N.; MAKMOR-BAKRY, M. Pathogenesis of epilepsy: challenges in animal models. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, p. 1119-32, 2013.

ZHAO, H., ZHU, C., HUANG, D. Microglial activation: an important process in the onset of epilepsy. **Am. J. Transl. Res.** 10, 2877-2889, 2018.

ANEXO - A CONFIRMAÇÃO DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1



Sub-Convulsing Dose Administration of Pilocarpine Reduces Glycemia, Increases Anxiety-Like Behavior and Decelerates Cortical Spreading Depression in Rats Suckled on Various Litter Sizes

Elían da Silva Francisco* and Rubem Carlos Araújo Guedes

Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Francisco Ciruela,
University of Barcelona, Spain

Reviewed by:

Eszter Farkas,
University of Szeged, Hungary
Frank Richter,
Universitätsklinikum Jena, Germany

*Correspondence:

Elían da Silva Francisco
ilansfrut@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 11 May 2018

Accepted: 16 November 2018

Published: 03 December 2018

Citation:

Francisco ES and Guedes RCA
(2018) Sub-Convulsing Dose
Administration of Pilocarpine Reduces
Glycemia, Increases Anxiety-Like
Behavior and Decelerates Cortical
Spreading Depression in Rats
Suckled on Various Litter Sizes.
Front. Neurosci. 12:897.
doi: 10.3389/fnins.2018.00897

Epilepsy and malnutrition constitute two worldwide health problems affecting behavior and brain function. The cholinergic agonist pilocarpine (300–380 mg/kg; single administration) reproduces the human type of temporal lobe epilepsy in rats. Pilocarpine-induced epilepsy in rodents has been associated with glycemia, learning and memory and anxiety disturbances. Cortical spreading depression (CSD) is a neural response that has been linked to brain excitability disorders and its diseases, and has been shown to be antagonized by acute pilocarpine. This study aimed to further investigate the effect of chronic pilocarpine at a sub-convulsing dose on weight gain, blood glucose levels, anxiety-like behavior and CSD. In addition, we tested whether unfavorable lactation-induced malnutrition could modulate the pilocarpine effects. Wistar rats were suckled under normal size and large size litters (litters with 9 and 15 pups; groups L₉ and L₁₅, respectively). From postnatal days (PND) 35–55, these young animals received a daily intraperitoneal injection of pilocarpine (45 mg/kg/day), or vehicle (saline), or no treatment (naïve). On PND58, the animals were behaviorally tested in an open field apparatus. This was immediately followed by 6 h fasting and blood glucose measurement. At PND60–65, CSD was recorded, and its parameters (velocity of propagation, amplitude, and duration) were calculated. Compared to the control groups, pilocarpine-treated animals presented with reduced weight gain and lower glycemia, increased anxiety-like behavior and decelerated CSD propagation. CSD velocity was higher ($p < 0.001$) in the L₁₅ groups in comparison to the corresponding groups in the L₉ condition. The results demonstrate an influence of chronic (21-day) administration of a sub-convulsing, very low dose (45 mg/kg) of pilocarpine on CSD propagation, anxiety-like behavior, glycemia and body weight. Furthermore, data reinforce the hypothesis of a relationship between CSD and brain excitability. The lactation condition seems to differentially modulate these effects.

Keywords: anxiety-like behavior, blood glucose, brain excitability, litter size, nutritional deficiency, pilocarpine, spreading depression, unfavorable lactation

ANEXO B - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

Dear Dr Francisco,

Frontiers Neuroscience Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Taurine/pilocarpine interaction in the malnourished rat brain: a behavioral, electrophysiological and immunohistochemical analysis" to be considered for publication in *Frontiers in Neuroscience*, section Neuroenergetics, Nutrition and Brain Health.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate.

Best regards,

Your *Frontiers* in Neuroscience team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team

ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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

Recife, 26 de junho 2015.

Ofício nº 62/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.015655/2015-99

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Interação taurina-pilocarpina em ratos jovens previamente amamentados em condições desfavoráveis: estudo eletrofisiológico e imunohistoquímico”**.

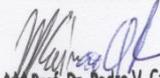
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição/ UFPE; Animais: rato heterogênico; Linhagem: Wistar; Idade: 7-70 dias; Peso: 15-250g; Sexo: machos; Nº total de Animais: 100.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584