

MANUELLA BATISTA DE OLIVEIRA

**ESTADO NUTRICIONAL PRECOCE E
ELETROESTIMULAÇÃO CEREBRAL NO RATO
ADULTO: EFEITOS SOBRE A DEPRESSÃO
ALASTRANTE CORTICAL**

RECIFE

2008

MANUELLA BATISTA DE OLIVEIRA

**Estado Nutricional Precoce e Eletroestimulação Cerebral no
Rato Adulto: Efeitos sobre a Depressão Alastrante Cortical**

Dissertação apresentada ao colegiado
do Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco para obtenção do grau de
Mestre em Nutrição.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes

-Recife- 2008

Oliveira, Manuella Batista de

Estado nutricional precoce e eletroestimulação cerebral no rato adulto: efeitos sobre a depressão alastrante cortical / Manuella Batista de Oliveira. – Recife: O Autor, 2008.
xi, 66 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Eletroestimulação cortical. 2. Nutrição – Condições de lactação. I. Título.

613.2
612.3

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

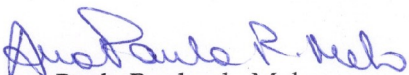
UFPE
CCS2008-049

**Estado nutricional precoce e eletroestimulação cerebral no
rato adulto: efeitos sobre a depressão alastrante cortical**

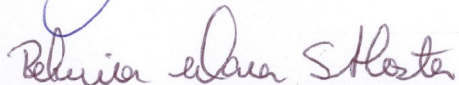
Manuella Batista de Oliveira

Data de Aprovação da Dissertação: 07 de março de 2008.

Banca Examinadora


1. Prof. Ana Paula Rocha de Melo;


2. Prof. Ângela Amâncio dos Santos;


3. Prof. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa.

-Recife- 2008

AGRADECIMENTOS

Em especial, aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio nos momentos mais árduos e pela confiança depositada em mim, que foram de fundamental importância para minha formação acadêmica e consecução deste projeto. Meus agradecimentos emocionados pela paciência, carinho e compreensão diante de tantas ausências em ocasiões especiais durante a realização deste trabalho.

A Daniel, pela amizade, companheirismo e paciência a mim dedicados. Em sua perseverança, confiança e amor, encontro sentido para continuar acreditando e lutando pelos meus sonhos.

Às amigas do LAFINNT, Kátia, Angélica, Luciana e Matilde pela amizade, companheirismo, carinho, atenção, apoio e motivação dedicados a mim.

À Prof. Ângela Amâncio por ter me aceitado como sua estagiária de iniciação científica durante a execução da sua Tese de Doutorado. A amizade, incentivo, apoio, companheirismo, críticas e ensinamentos, que recebi desta amiga e professora, foram excepcionais para traçar meu futuro profissional e para a realização deste projeto.

Às estagiárias Ana Karla Paiva, Hélen, Natália e Geórgia pela cooperação em algumas etapas desta dissertação.

Ao professor, orientador e amigo *Prof. Rubem Guedes*, meus agradecimentos especiais pela oportunidade concedida desde a graduação, que foi essencial tanto para minha formação profissional, quanto para o meu desenvolvimento pessoal. É difícil agradecer em poucas linhas pela amizade, apoio, incentivo e ensinamentos dedicados a mim pelo Prof. Rubem que sempre, com muita humildade e paciência, mostrou a maneira mais perspicaz de encarar as vicissitudes da vida. Tal postura sempre direcionou minha formação, me inspirando a lutar pelos meus objetivos e acreditar nos meus ideais.

Ao *CNPq*, pela concessão do apoio financeiro, através das Bolsas que suportaram o período de Iniciação Científica (PIBIC) e o Mestrado em Nutrição, indispensável à minha formação.

Agradeço *a todos* que colaboraram durante mais esta etapa, pelo apoio, críticas e motivação. Para não incorrer no erro da omissão, optei por não nomeá-los particularmente. Meu eterno agradecimento e um abraço forte a todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, **meus agradecimentos especiais** são também direcionados **a Deus** pela oportunidade que me foi concedida por ele, por iluminar meus passos e meus pensamentos, trazendo conforto nas horas mais difíceis e me dando saúde para continuar buscando minhas metas e aproveitando minhas conquistas.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag -AgCl	Prata- Cloreto de Prata
ANOVA	“ANalysis Of VAriance”: Análise de Variância;
AEN	Atividade elétrica neuronal ;
CFN	Condições favoráveis de nutrição;
DAC	Depressão alastrante cortical;
DBR	Dieta Básica Regional;
D-DBR	Desnutridos pela “dieta básica regional;
ECr	Eletroestimulação cortical repetitiva;
EMTr	Estimulação magnética transcraniana repetitiva;
ETCD	Estimulação transcraniana com corrente direta;
IAE	Ingestão alimentar excessiva;
KCl	Cloreto de potássio;
LD12	Lactação desfavorável. Desnutrido pelo modelo das grandes ninhadas (12 filhotes por ninhada);
LF3	Lactação favorável. Animais criados em pequenas ninhadas (3 filhotes por ninhada);
N6	Normonutrido (6 filhotes por ninhadas);
SN	Sistema nervoso;
SNC	Sistema nervoso central;
SHAM	Grupo de animais submetidos à estimulação fictícia;
VLV	Variação lenta de voltagem;

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.0</u> Esquema demonstrativo dos grupos experimentais.....	30
<u>Figura 2.0</u> - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo N6.....	36
<u>Figura 3.0</u> - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo N- <i>sham</i>	37
<u>Figura 4.0</u> - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo experimental LF 3.....	38
<u>Figura 5.0</u> - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo experimental LD 12.....	39
<u>Figura 6.0</u> - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR).....	40
<u>Figura 7.0</u> - Variações das velocidades de propagação da DAC após a ECr	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.0 – Condições de interesse clínico que facilitam ou inibem a propagação da DAC.....	21
Tabela 2.0 - Composição centesimal da “Dieta Básica Regional” (DBR).....	26
Tabela 3.0 - Composição da dieta de manutenção do biotério: “Labina”.....	27
Tabela 4.0 – Pesos corporais dos ratos criados em diferentes condições de lactação.....	33
Tabela 5.0 - Velocidades médias de propagação da DAC.....	41
Tabela 6.0 - Número de DACs espontâneas.....	42

RESUMO

A eletroestimulação cortical repetitiva (ECr) aumenta a susceptibilidade à depressão alastrante cortical (DAC) em ratos nutricionalmente normais (FREGNI, *et al.*, 2005). O presente trabalho investigou se as **condições de lactação** poderiam influenciar os efeitos da ECr sobre a DAC. O estado nutricional foi manipulado durante o aleitamento modificando-se o número de filhotes em cada ninhada, originando grupos de lactação desfavorável (LD12), normonutrido (N6) e lactação favorável (LF3), compostos por filhotes amamentados em ninhadas com 12, 6 e 3 lactentes, respectivamente. Em outro grupo (D-DBR), a *desnutrição* foi induzida alimentando-se as mães lactantes com dieta hipoprotéica (“Dieta Básica Regional”, DBR, contendo 8% de proteína). Do desmame (21 dias de idade) aos 60 dias, a dieta de manutenção do biotério (“Labina”, com 23% de proteína) foi oferecida a todos os filhotes. Nessa idade, a DAC foi registrada em dois pontos de cada hemisfério cerebral por 2h (registro basal). Em seguida, a ECr foi aplicada por 20 minutos no córtex esquerdo, por meio de um eletrodo bipolar situado entre os eletrodos de registro da DAC. O registro da DAC continuou por mais duas horas. A manipulação precoce do estado nutricional influenciou, de maneira estatisticamente significativa, os pesos corporais (o grupo D-DBR apresentou o menor peso e o grupo LF3 foi o mais pesado) e as velocidades de propagação da DAC na vida adulta ($LF3 < N6 < LD12 < D-DBR$). Em todos os grupos, a ECr aumentou a velocidade de propagação da DAC, no hemisfério estimulado [média $\pm$ epm, LF3 ($14,65\% \pm 1,10$), N6 ($25,70\% \pm 5,05$), LD12 ($10,13\% \pm 1,70$), D-DBR ($13,19\% \pm 1,02$)] e, só no grupo LF3, também no hemisfério não-estimulado ($8,66\% \pm 1,38$). A importância clínica da utilização desta técnica no tratamento de distúrbios que envolvam a diminuição da excitabilidade cerebral, como acidentes vasculares cerebrais, depressão maior e doença de *Parkinson*, tem sido destacada por diversos autores (BENABID, 2003; FREGNI e PASCUAL-LEONE, 2007). Os efeitos benéficos parece serem devidos ao aumento na excitabilidade cortical provocado pela ECr. Mecanismos como o envolvimento de neurotransmissores e/ou íons e a geração de “potenciação de longo prazo” poderiam explicar as modificações na velocidade da DAC. Os resultados representam apoio científico para a compreensão dos efeitos da estimulação elétrica em certas patologias neurais, associadas ou não a alterações nutricionais durante o desenvolvimento cerebral, assim como para o uso da DAC como modelo de estudo experimental destas abordagens terapêuticas, em associação com condições nutricionais específicas prevalentes no período de desenvolvimento cerebral.

Palavras-chave: Eletroestimulação cortical. Condições de lactação. Depressão alastrante.

ABSTRACT

The repetitive cortical electric stimulation (rCES) increases cortical spreading depression (CSD) propagation in the stimulated hemisphere of well-nourished rats (FREGNI, et al., 2005). This work investigated whether lactation conditions could influence the rCES-effect on CSD. The nutritional status was manipulated during the lactation period. Wistar rats pups were suckled in unfavorable lactation conditions (LD12, 12 pups per litter), standard lactation (well-nourished [N6] 6 pups per litter) and favorable lactation (LF3, 3 pups per litter). In other group (M-BRD), the malnutrition was performed in sucklings by feeding their lactating mothers a *low-protein* diet ("Basic Regional Diet", BRD, containing 8% of protein). From weaning to 60 days of age, all pups received a standard lab-chow (LABINA, with 23% protein). At this age, CSD was recorded on 2 cortical surface points of each cerebral hemisphere. After a 2-h "baseline recording", rCES was applied for 20 min on the left cortex with a bipolar electrode placed between the CSD recording electrodes. The CSD recording continued for two more hours. The early nutritional status manipulation significantly influenced the body weights (the M-BRD group presented the lowest weights and the LF3, the highest ones) as well as the CSD velocities of propagation in adulthood (LF3 < N6 < LD12 < D-DBR). In all groups, rCES increased the CSD velocity of propagation, in the stimulated hemisphere [mean $\pm$ sem, LF3 (14,65% $\pm$ 1,10), N6 (25,70% $\pm$ 5,05), LD12 (10,13% $\pm$ 1,70), D-DBR (13,19% $\pm$ 1,02)]. Additionally, this CSD-effect was seen, in the LF3 group, in the non-stimulated hemisphere (8,66% $\pm$ 1,38).. The clinical relevance of this technique for the treatment of human neural disorders which involves a reduction in the cerebral excitability, as stroke, major depression and Parkinson's disease, have been stressed by several researchers (BENABID, 2003; FREGNI e PASCUAL-LEONE, 2007). The beneficial effect seems to be due to the increase in the cortical excitability provoked by the rCES. The underlying mechanisms are still insufficiently understood, but the participation of neurotransmitters and/or ions as well as long-term potentiation could explain the modifications in the CSD velocities. The data represents scientific support to the understanding of the electrical stimulation effects in some neurological pathologies, associated or not to nutritional alterations during the brain development, as well as for the use of CSD as a model for experimental studies of that therapeutic resource, in association with specific nutritional prevailing conditions in the cerebral development period.

Key words: Cortical Electrical Stimulation. Lactation Conditions. Spreading Depression.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. HIPÓTESES.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo geral.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. METODOLOGIA.....	24
5.1 Manipulação do estado nutricional.....	24
5.2 Procedimentos cirúrgicos para os registros eletrofisiológicos.....	28
5.3 Registro eletrofisiológico.....	28
5.4 Eletroestimulação cortical.....	29
5.5 Determinações Ponderais.....	31
5.6 Análise estatística.....	31
6 RESULTADOS.....	32
7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÕES.....	55
9 PERSPECTIVAS.....	56
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
11 ANEXOS.....	66

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Manipulação nutricional e sistema nervoso

O desenvolvimento do encéfalo, nos seus distintos aspectos (físico, químico e fisiológico), bem como os conseqüentes comportamentos, em todas as espécies de mamíferos evoluem a partir da interação contínua de fatores genéticos e ambientais. Nestes últimos fatores, estão incluídos aqueles dependentes da educação, das doenças e de variáveis culturais e nutricionais (MORGANE, *et al.*, 1993).

Não há dúvidas de que a nutrição adequada no início da vida é importante para o desenvolvimento normal do sistema nervoso (SN) de mamíferos. Durante os períodos de crescimento e maturação cerebral, há alguns momentos “vulneráveis”, nos quais os efeitos deletérios da nutrição inadequada podem interferir criticamente. A nutrição inadequada pode influenciar os mecanismos reguladores, produzindo alterações estruturais e metabólicas do SN em desenvolvimento (MORGANE, *et al.*, 1993; GRANTHAM-MCGREGOR, 1995; GRANTHAM-MCGREGOR, *et al.*, 1998; GUEDES, 2005; SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2002; GALANOPOULOU & MOSHÉ, 2002 e YOUNG, 2002).

Nas fases iniciais da vida, os processos envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso (gliogênese, neurogênese, migração, diferenciação celular, mielinização, formação de sinapses, síntese e liberação de neurotransmissores) ocorrem com velocidade máxima. Essa fase é denominada de período crítico ou período de crescimento rápido do cérebro, porque nela o sistema nervoso é mais vulnerável às agressões externas como, por exemplo, a deficiência nutricional (DOBBING, 1968).

Este período crítico ocorre em épocas diferentes nas diversas espécies animais. Em alguns mamíferos, o desenvolvimento cerebral começa na embriogênese e continua durante uma fase relativamente curta da vida pós-natal. Em outros, como o rato, ele ocorre essencialmente no período do aleitamento. Nos seres humanos, o período crítico estende-se do terceiro trimestre da gestação até os primeiros dois a quatro anos de vida pós-natal (SMART e DOBBING, 1971).

A influência da nutrição sobre o desenvolvimento cerebral no início da vida e suas conseqüências duradouras sobre a função mental tem motivado uma série de estudos; alguns investigaram, particularmente, os efeitos da desnutrição (MORGANE, *et al.*, 1993; GRANTHAM-MCGREGOR, 1995; GRANTHAM-MCGREGOR, *et al.*, 1998; GUEDES, 2005; SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2002; GALANOPOULOU & MOSHÉ, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2002) enquanto, outros, os efeitos do sobrepeso/ obesidade (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004 e 2006; PLAGEMANN *et al.*, 1998; 1999; VELKOSKA E. *et al.*, 2005; DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2000; DAVIDOWA *et al.*, 2003)

Apesar de estudos demonstrarem um declínio progressivo da desnutrição infantil nos países em desenvolvimento (ONIS *et al.*, 2000), a desnutrição em crianças ainda é considerado um sério problema de saúde pública nestes países, inclusive em algumas regiões do Brasil. Os efeitos da desnutrição sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) têm sido estudados, principalmente, devido à incidência da desnutrição infantil e às evidências consideráveis de seus efeitos neurais, alguns deles permanentes. Estes últimos, geralmente estão associados com danos à função mental, inclusive déficits da inteligência (GRANTHAM-McGREGOR, 1990).

Dados epidemiológicos confirmam uma mudança no perfil nutricional mundial especialmente em crianças e adolescentes, caracterizada por um declínio progressivo da

prevalência da desnutrição e uma rápida elevação de sobrepeso/obesidade (OKEN *et al.*, 2003; BATISTA-FILHO e RISSIN, 2003; KOHN e BOOTH, 2003). Portanto, a influência da ingestão alimentar excessiva (IAE) sob o crescimento e desenvolvimento do SN começa a gerar grande interesse. Embora menos investigado, é atualmente aceito que uma ingestão alimentar excessiva no início da vida pode também interferir no desenvolvimento e função cerebral (DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2002; PLAGEMANN *et al.*, 1998 e VELKOSKA *et al.*, 2005). Em nosso laboratório, estudos preliminares com ratos previamente submetidos a IAE, segundo a técnica descrita por PLAGEMANN *et al.* (1998), demonstraram alterações ponderais e histoquímicas cerebrais (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004) e modificações eletrofisiológicas da DAC (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006).

Além da nutrição, a eletroestimulação cerebral, utilizada com fins terapêuticos, parece modular a função cerebral. A utilização clínica dessa técnica tem aumentado durante a última década. Entretanto os seus mecanismos de ação ainda não estão bem esclarecidos. Um dos mecanismos propostos é que a eletroestimulação repetitiva aumente a excitabilidade do córtex cerebral (FREGNI *et al.*, 2005). Portanto os efeitos da associação dessas duas variáveis foram estudados neste trabalho, como descrito adiante.

1.2 Eletroestimulação cortical, sistema nervoso e manipulação nutricional

Trabalhos recentes têm demonstrado que a eletroestimulação cortical pode influenciar o funcionamento do cérebro. Várias formas de estimulação elétrica cerebral parecem ser efetivas no tratamento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos. A estimulação magnética transcraniana e a estimulação transcraniana com corrente direta (contínua) fraca têm demonstrado efeitos benéficos no tratamento de pacientes com doença de Parkinson, depressão maior, epilepsia, esquizofrenia e acidentes vasculares cerebrais (BENABID, 2003; BURT *et al.*, 2002).

A ECr é um tipo de estimulação elétrica cortical, que mimetiza a técnica da estimulação magnética transcraniana (FREGNI *et al.*, 2007) e pode gerar uma mudança na atividade cortical cerebral da área estimulada por um período prolongado (FREGNI *et al.*, 2005 e PASCUAL-LEONE *et al.*, 1998). As séries de ECr podem induzir efeitos imediatos de modulação na excitabilidade cortical. Essa modulação pode variar entre inibição e facilitação da atividade cerebral, dependendo dos parâmetros de ECr utilizados (PASCUAL-LEONE *et al.*, 1998; MAEDA *et al.*, 2000), bem como da região estimulada (BOËX *et al.*, 2007). A ECr tem se tornado uma abordagem terapêutica para certas indicações como acidentes vasculares cerebrais e epilepsia (FREGNI & PASCUAL-LEONE, 2007).

Uma vez que, como mencionado acima, um dos mecanismos propostos para explicar a ação terapêutica da ECr seria baseado na modulação da excitabilidade cortical (FREGNI *et al.*, 2005), decidiu-se utilizar, no presente trabalho, o fenômeno da DAC, como um instrumento para o estudo dessa excitabilidade. Além de ser um método experimental para avaliação de alterações da excitabilidade do tecido cortical (vide item 1.3 adiante), a DAC apresenta pontos de semelhança com certas patologias neurais, tais como epilepsia, enxaqueca com aura e isquemia cerebral, fazendo suspeitar da

existência de mecanismos comuns entre eles (LEÃO, 1972; LEHMENKÜHLER *et al.*, 1993; TAKANO *et al.*, 1996; GUEDES, 2005). Por exemplo, essa relação entre mecanismos envolvidos na enxaqueca com aura e a DAC fala a favor da associação entre a DAC e a excitabilidade cortical (LEHMENKÜHLER *et al.*, 1993). Algumas coincidências interessantes, como o fato de que esses fenômenos apresentam velocidades de propagação semelhantes (LAURITZEN, 1994 e GORGI, 2001) são também favoráveis a essa associação. Além disso, a hipoglicemia, que pode desencadear episódios de enxaqueca com aura (JACOME, 2001) está também associada a um aumento na susceptibilidade à DAC (COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001).

Com a perspectiva acima, pode-se afirmar que o presente estudo poderia trazer achados relevantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na utilização clínica da ECr, e ainda, se estes mecanismos podem ser influenciados por alterações precoces do estado nutricional, mediante o estabelecimento de condições experimentais favoráveis ou desfavoráveis de lactação (ingestão alimentar excessiva ou deficiente, respectivamente), conforme descreve a literatura (PLAGEMANN *et al.*, 1998; DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2000; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004; 2006).

1.3 Depressão alastrante cortical, manipulação nutricional e estimulação elétrica cortical

Técnicas diferentes no campo da eletrofisiologia podem ser utilizadas para registrar a atividade elétrica cerebral em animais de laboratório e em humanos. A atividade elétrica neuronal (AEN) é a principal característica fisiológica do tecido nervoso. Através da AEN, o encéfalo é capaz de executar diversas ações fisiológicas, desde as mais simples, até as mais complexas. Logo, as técnicas que permitam o registro e a análise dessa atividade podem fornecer informações relevantes para a

compreensão do funcionamento do sistema nervoso, tanto sob condições normais, como patológicas (GUEDES, 2005).

Estudos eletrofisiológicos têm sido desenvolvidos no “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT; Departamento de Nutrição da UFPE), numa linha de pesquisa em colaboração com o Dr. Felipe Fregni, do Centro de Estimulação não-invasiva da Faculdade de Medicina da Universidade de Harvard e Centro Médico *Beth Israel Deaconess*, Boston, USA e com o Dr. David Liebetanz, do Departamento de Neurofisiologia Clínica, Universidade Georg-August, Goettingen, Alemanha. Nessa linha, tem se utilizado o fenômeno da DAC para o estudo dos efeitos da ECr (FREGNI *et al.*, 2005), da estimulação transcraniana com corrente direta (ETCD, LIEBETANZ *et al.*, 2006) e da combinação destas técnicas (ETCD e ECr, FREGNI *et al.*, 2007) sobre a excitabilidade cortical. A presente dissertação dá continuidade a essa linha de pesquisa.

A DAC foi descrita pela primeira vez como uma “onda” propagável de depressão da atividade elétrica cortical espontânea (LEÃO, 1944). O fenômeno consiste numa resposta reversível do tecido cortical, provocada por estimulação elétrica, mecânica ou química, de um ponto desse tecido. Essa depressão propaga-se de forma concêntrica por todo o córtex (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min) e ao final, cerca de 10 a 15 min, o tecido cortical acha-se recuperado. À medida que a DAC se propaga para regiões cada vez mais afastadas, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir do ponto estimulado. Acompanhando a depressão da atividade elétrica espontânea, foi observada uma variação lenta de voltagem (VLV) na região cortical onde estava ocorrendo a DAC (LEÃO, 1944; 1947).

O uso da DAC para investigação experimental apresenta duas razões principais: 1) fornecer uma maneira simples e interessante de estudar aspectos nutricionais e do desenvolvimento da eletrofisiologia cerebral; 2) favorecer a compreensão dos

mecanismos da DAC que pode ser extremamente importante para auxiliar no melhor conhecimento e tratamento de patologias neurais humana, tais como epilepsia, enxaqueca com aura e isquemia cerebral (GUEDES, 2005).

Desde a primeira descrição da DAC muitos estudos têm sido feitos para esclarecer os processos responsáveis por este fenômeno. A susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC depende das condições em que se encontra o tecido cerebral. Dessa forma, em alguns casos, o córtex pode apresentar uma maior susceptibilidade ao fenômeno, indicada por velocidades de propagação mais altas, e em outros casos se tornar mais resistente, a julgar pelas velocidades mais baixas.

Os estudos em nosso laboratório têm identificado uma série de condições de interesse clínico, que podem facilitar a propagação da DAC, enquanto outras podem inibir esse fenômeno. Dentre as condições que dificultam a propagação da DAC pode-se citar o envelhecimento (GUEDES *et al.*, 1996), o uso de anestésicos (GUEDES e BARRETO, 1992), o hipotireoidismo (GUEDES e PEREIRA-DA-SILVA, 1993), tratamento agonistas serotoninérgicos (GUEDES *et al.*, 2002 e AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006), aplicação tópica cortical de antagonistas de aminoácidos excitatórios (GUEDES *et al.*, 1988), hiperglicemia (COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001), estimulação ambiental precoce (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000) e aleitamento em condições muito favoráveis (redução da ninhada para 3 filhotes; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006). Por outro lado, dentre as condições que facilitam a propagação da DAC, identificou-se a redução do cloreto extracelular (por lavagem gástrica, GUEDES e Do CARMO, 1980), tratamento com agonistas GABAérgicos (GUEDES *et al.*, 1992), hipoglicemia (XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991), privação dietética de vitaminas antioxidantes (EL-BACHÁ *et al.*, 1998) e aleitamento em condições desfavoráveis, seja por deficiência nutricional da mãe lactante (GUEDES *et al.*, 1987a e

ANDRADE *et al.*, 1990), seja por aumento da ninhada de 6 para 12 filhotes (ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006). Estas condições estão apresentadas na **tabela 1.0**.

Com relação aos efeitos da ECr sobre a DAC, FREGNI *et al.*, (2005) demonstraram em ratos normonutridos que a ECr, aplicada com a frequência de 1 Hz em um dos hemisférios cerebrais, aumenta a velocidade de propagação da DAC apenas no hemisfério estimulado. Ao utilizar a DAC como modelo experimental, o presente trabalho tem a justificativa descrita a seguir.

Tabela 1.0 – Condições de interesse clínico que facilitam ou inibem a propagação da DAC.

Condições de interesse clínico	Referência bibliográfica
<i>Condições que dificultam a DAC</i>	
Envelhecimento	GUEDES <i>et al.</i> , 1996
O uso de anestésicos	GUEDES e BARRETO, 1992
O hipotireoidismo	GUEDES e PEREIRA-DA-SILVA, 1993
Tratamento com drogas que aumentam a atividade do sistema serotoninérgico	GUEDES <i>et al.</i> , 2002 e AMÂNCIO-DOS-SANTOS <i>et al.</i> , 2006
Aplicação tópica cortical de antagonistas de aminoácidos excitatórios	GUEDES <i>et al.</i> , 1988
Tratamento com carotenóides	BEZERRA <i>et al.</i> , 2005
Hiperglicemia	COSTA-CRUZ e GUEDES, 2001
Estimulação ambiental precoce	SANTOS-MONTEIRO <i>et al.</i> , 2000
Redução do tamanho da ninhada de 6 para 3 filhotes (pequenas ninhadas)	ROCHA-DE-MELO <i>et al.</i> , 2006
<i>Condições que facilitam a DAC</i>	
Redução do cloreto extracelular por lavagem gástrica	GUEDES e Do CARMO, 1980
Desnutrição no início da vida por alimentação materna deficiente	GUEDES <i>et al.</i> , 1987a e ANDRADE <i>et al.</i> , 1990
Tratamento com agonistas GABAérgicos	GUEDES <i>et al.</i> , 1992
Hipoglicemia	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991
Tratamento com etanol	GUEDES E FRADE, 1993; BEZERRA <i>et al.</i> , 2005
Privação dietética de vitaminas antioxidantes	EL-BACHÁ <i>et al.</i> , 1998
Aumento da ninhada de 6 para 12 filhotes (grandes ninhadas)	ROCHA-DE-MELO <i>et al.</i> , 2006

Modificada de GUEDES, 2005.

2.0 JUSTIFICATIVA

Em nosso laboratório, achados recentes mostraram que a propagação da DAC encontra-se facilitada em animais submetidos a sessões de ECr (FREGNI *et al.*, 2005). Para complementar a investigação dos efeitos da eletroestimulação cortical sobre a excitabilidade cerebral, esta dissertação investigou, em animais normonutridos, ou amamentados em condições desfavoráveis ou favoráveis, o uso da estimulação cortical direta como meio eficaz de interferir na excitabilidade cerebral. Esta abordagem experimental pode contribuir para a investigação dos mecanismos de ação da ECr, bem como para compreensão de possíveis associações dos efeitos da ECr ao estado nutricional precoce.

Dessa forma, este trabalho pode também trazer uma contribuição interessante e *pioneira* para a compreensão da relação entre *alimentação, nutrição, eletroestimulação cortical, desenvolvimento e função neural*.

3.0 HIPÓTESES

- A ECr aplicada sobre o córtex cerebral esquerdo durante o registro eletrofisiológico facilita a propagação da DAC;
- O efeito da ECr durante o registro da DAC se faz de forma assimétrica, limitando-se ao hemisfério estimulado;
- Esses efeitos da ECr sobre a DAC são influenciados também pela condição nutricional (*desnutrição ou ingestão alimentar excessiva*) a que o cérebro foi submetido no início da vida.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar, em ratos entre 60 e 90 dias de vida, amamentados em condições favoráveis, ou normais, ou desfavoráveis, os efeitos da eletroestimulação cortical sobre a propagação da depressão alastrante (DAC).

4.2 Objetivos específicos

- Acompanhar a evolução do peso corporal durante todo o período de experimentação (ver tópico ***Determinações Ponderais***), correlacionando esse peso com a respectiva condição (favorável ou desfavorável) de aleitamento;
- Avaliar a influência da alteração no estado nutricional precoce (aleitamento) sobre os efeitos da ECr durante a propagação da DAC;
- Investigar a associação entre o tipo de desnutrição (dieta materna multideficiente ou aumento do número de filhotes por ninhada) e os efeitos da ECr sobre a velocidade de propagação da DAC e a incidência de DACs espontâneas;
- Comparar a velocidade de propagação da DAC nos dois hemisférios cerebrais, para verificar se o efeito da ECr, aplicada unilateralmente, estará limitado ao hemisfério estimulado.

5.0 METODOLOGIA

Foram utilizados 52 ratos machos albinos da linhagem *Wistar*, da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Esses ratos foram mantidos sob condições padrão do biotério, em sala à temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o claro iniciando às 7 horas da manhã), com livre acesso à água e à comida.

Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 001166/2007-40).

Para formar as ninhadas dos grupos nutricionais descritos abaixo, ratos neonatos, com 24h após o nascimento, provenientes de várias ninhadas, foram reunidos em um único grupo e em seguida aleatoriamente distribuídos, segundo a manipulação do estado nutricional, descrita a seguir.

5.1 Manipulação do estado nutricional no aleitamento

Em cada grupo, a condição nutricional foi determinada variando-se o número de filhotes por ninhada, ou seja, os grupos experimentais foram divididos em *lactação desfavorável (LD12)*, *normonutrido (N6)* e *lactação favorável (LF3)*, os quais eram compostos por filhotes amamentados em ninhadas formadas por 12, 6 e 3 lactentes, respectivamente, conforme descrito por PLAGEMANN *et al.*, 1998; DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2000; ROCHA-DE-MELO *et al* (2004; 2006). Em um outro grupo, para comparação, outra forma de *desnutrição (D-DBR)* foi induzida em lactentes cujas mães, no aleitamento, receberam uma dieta multideficiente (“Dieta Básica Regional”, DBR, ver *tabela 2.0 para composição*; Teodósio *et al.*, 1990), contendo 8% de proteína. Após o desmame, aos 21 dias, todos os filhotes foram alimentados com a dieta de

manutenção do biotério (“Labina”, ver *composição na tabela 3.0*), com 23% de proteína.

A DBR representa um modelo de desnutrição experimental elaborado com alimentos que constituíam a base da alimentação de famílias de comunidades rurais do Nordeste brasileiro (Zona da Mata do Estado de Pernambuco). Esses alimentos foram determinados após um inquérito nutricional realizado nesta região elaborado pelo Departamento de Nutrição da UFPE (BATISTA-FILHO *et al.*, 1968).

Uma refeição ideal deve seguir preceitos básicos: a adequação da quantidade e da qualidade de seus constituintes. A DBR é uma alimentação rica em carboidratos e fibras, entretanto, pobre em gorduras, proteínas, vitaminas e sais minerais, e ainda, as proteínas presentes são predominantemente de origem vegetal, ou seja, uma proteína de baixo valor biológico. Mostra-se, portanto, bastante inadequada.

Segundo alguns estudos experimentais, a DBR pode levar a alterações significativas em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e metabólicos do sistema nervoso, similares aos observados em humanos desnutridos (ANDRADE *et al.*, 1990; GUEDES, 1984; SANTOS-MONTEIRO *et al.* 2000; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; TEODÓSIO *et al.*, 1990; BARROS *et al.*, 2006).

Tabela 2.0 Composição centesimal da “Dieta Básica Regional” (DBR), segundo TEODÓSIO et al., 1990. PTN: proteína; HC: carboidratos; L: lipídios e F: fibras

Ingredientes	Composição (g%)						
	g %	PTN	HC	L	C	F	Kcal %
Feijão mulatinho (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Farinha de mandioca (<i>Manioc esculenta</i>)	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,80
Carne de charque ^a	3,74	2,74	-	0,06	0,06	-	11,5
Gordura de charque	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata doce ^a (<i>Ipomaea batatas</i>)	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
Total	100,0	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,64

^a = cozido, seco e moído.

Tabela 3.0 Composição da dieta de manutenção do biotério: “Labina”

Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bocálcico, sal, pré-mix.	
ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO	
Vitamina A	20.000 UI
Vitamina D ₃	6.000
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B ₁₂	10 mg
Vitamina B ₂	28 mg
Pantotenato de cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2.000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1 mg
Ácido fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg
NÍVEIS DE GARANTIA	
Umidade (máx)	13%
Proteína (mín)	23%
Extrato Etéreo (mín)	4,0%
Matéria fibrosa (máx)	5,0%
Matéria mineral (máx)	10,0%
Cálcio (Ca)(máx)	1,3%
Fósforo (P)	0,85%

* Fonte: PURINA do Brasil Ltda, consulta ao site:
http://www.agribands.com.br/produtos_labina_labina.asp dia 22 de janeiro de 2008, às 21:25h.

5.2 Procedimentos cirúrgicos para os registros eletrofisiológicos

Entre 60-75 dias de idade, os animais foram anestesiados com uma solução de uretana a 10% + cloralose a 0,4%, à dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intra-peritoneal. O animal permaneceu respirando espontaneamente e foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável, para manutenção da sua temperatura retal em $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, que foi verificada continuamente por um termômetro. Em seguida, a cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico (marca "David - Kopf", USA, modelo 900), de modo a permitir a incisão da pele e a remoção do periósteo para exposição do crânio. Por meio de trepanação, foram feitos 6 orifícios, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada, sendo 3 em cada lado do crânio, alinhados no sentido antero-posterior e paralelamente à linha média.

5.3 Registro eletrofisiológico

Os registros eletrofisiológicos foram feitos com eletrodos do tipo "Ag-AgCl", confeccionados no próprio laboratório (ver Guedes et. al.,1992), conectados a um polígrafo modelo 7D (Grass Medical Instruments).

Os registros da variação lenta de voltagem (VLV) que acompanha a DAC foram feitos durante 4 horas (2 horas pré-eletoestimulação e 2 horas pós-eletoestimulação), por 2 pares de eletrodos "registradores", um par em cada hemisfério na área fronto-parietal. Os eletrodos registradores foram colocados sobre essas regiões corticais com o objetivo de registrar a atividade eletrofisiológica em áreas equivalentes ao córtex motor, conforme descrito previamente (FREGNI *et al.*, 2005). Um quinto eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre os ossos nasais e serviu de referência comum ("eletrodo de referência") aos 4 eletrodos registradores.

A DAC foi provocada, a cada 20-30 minutos, por estimulação química: uma pelota de algodão de 1 a 2 mm de diâmetro, embebida em uma solução de cloreto de potássio (KCl) a 2%, foi colocada durante 1 minuto sobre um ponto da superfície cortical, através do orifício de estimulação, na região parietal posterior. A estimulação química com KCl foi realizada em cada hemisfério alternadamente com intervalo de 10-15 min entre elas, de modo que cada hemisfério sofreu estimulações a intervalos de 20-30 minutos, como mencionado anteriormente.

A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância. Para cada uma das horas de registro foram calculadas as velocidades médias de propagação do fenômeno.

5.4 Eletroestimulação Cortical

A eletroestimulação cortical repetitiva (ECr), conforme mencionado anteriormente, é uma técnica de eletroestimulação que mimetiza a estimulação magnética transcraniana repetitiva [EMTr (FREGNI *et al.*, 2007)]. A ECr foi utilizada neste estudo por causa das limitações técnicas da EMTr em ratos, uma vez que as bobinas de indução eletromagnética utilizadas para a EMTr em humanos, se usadas em ratos resultaria numa estimulação difusa e isto não seria adequado para o presente estudo.

A ECr foi realizada durante o registro eletrofisiológico. Após as 2 horas iniciais (“registro basal”) o registro da DAC foi interrompido e a ECr foi aplicada sobre o córtex esquerdo através de um par de eletrodos bipolares metálicos (fios de prata isolados com teflon, com a distância entre as pontas igual a 0,5 mm), sendo o ânodo situado próximo ao orifício parietal anterior e o cátodo próximo ao orifício frontal,

colocados na superfície cortical, no espaço entre os dois eletrodos de registro da DAC. Esta ECr foi aplicada por um estimulador elétrico (*Insight*, Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil) durante 20 minutos com os seguintes parâmetros, anteriormente utilizados por FREGNI *et al.*, (2005): frequência 1 Hz, intensidade de 600 μ A e duração de pulso de 5ms. Ao término da ECr, o registro da DAC foi retomado e continuou por mais duas horas. A comparação, no mesmo animal, das velocidades da DAC antes e após a eletroestimulação cortical serviu para indicar eventuais efeitos da ECr sobre a DAC. Neste experimento, o animal serviu de controle para ele mesmo. As velocidades de propagação da DAC no período pós-ECr foram comparados com os valores pré-ECr (registro basal). Para excluir possíveis efeitos da colocação dos eletrodos na superfície cortical sobre a propagação da DAC, foi estudado um grupo *sham* (estimulação fictícia). Os animais desse grupo foram submetidos à colocação dos eletrodos corticais usados para a ECr, bem como a todos os demais procedimentos realizados nos grupos estimulados com a ECr, porém o aparelho de eletroestimulação permanecia desligado durante todo o registro da DAC. Os grupos experimentais estão descritos na **Figura 1.0**.

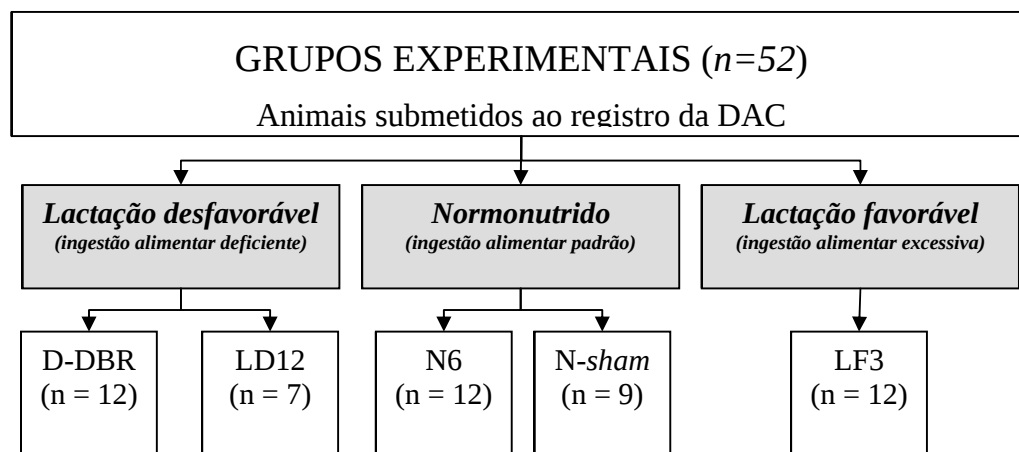


Figura 1. Esquema demonstrativo dos grupos experimentais. Ratos foram amamentados em ninhadas formadas por 12, 6 e 3 lactentes: lactação desfavorável (LD12), normonutrido (N6) e lactação favorável (LF3), respectivamente. Animais D-DBR foram criados em ninhadas de 6 filhotes e amamentados por nutrízes alimentadas com DBR-dieta básica regional. Estes animais foram submetidos à ECr durante o registro da DAC aos 60 a 90 dias de vida. Sham- grupo de animais que não foi estimulado (estimulação fictícia, vide tópico 5.4 da metodologia). Os valores entre parênteses indicam a quantidade de ratos em cada grupo.

5.5 Determinações Ponderais

O peso corporal foi obtido aos 7, 14, 21, 30 e 60 dias de vida e no dia do registro eletrofisiológico da DAC. Os animais foram pesados em balança Marte (modelo 1001). Os pesos corporais foram comparados entre os grupos (N6, LD12, D-DBR e LF3) e analisados estatisticamente segundo descrição adiante.

5.6 Análise estatística

Os dados eletrofisiológicos e a evolução do peso corporal foram analisados estatisticamente utilizando-se a “ANOVA”- análise de variância, seguida por teste “post hoc” (Tukey), quando indicado. No que diz respeito à análise da velocidade de propagação da DAC intra-grupo, nos momentos pré- e pós-ECr, bem como na comparação entre os dois hemisférios do mesmo animal, foi utilizado o teste “t” pareado. Foram consideradas significantes as diferenças em que $p=0,05$.

6.0 RESULTADOS

6.1 Pesos corporais

Os pesos corporais médios dos diferentes grupos nutricionais, quando em ordem crescente, apresentaram a seguinte seqüência: D-DBR<LD12<N<LF3, isto é, o grupo D-DBR apresentou o menor peso e o grupo LF3 foi o mais pesado. Estes resultados estão apresentados na **Tabela 4.0**. Os animais D-DBR apresentaram peso corporal significativamente menor que os animais N e LF3 em todas as idades avaliadas. Quando comparados aos animais do grupo LD 12, os ratos D-DBR apresentaram pesos corporais significativamente menores ao longo das determinações ponderais, exceto no 7º dia de vida.

Os ratos do grupo LD12 apresentaram pesos corporais, nos 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida, significativamente menores do que os ratos N e LF3. No 60º dia de vida e no dia do registro da DAC, estes animais tiveram seus pesos corporais significativamente maiores que o dos animais DBR e menores que os do grupo LF3.

Em comparação com o grupo N, os animais LF3 tiveram pesos corporais significativamente maiores nos 7º, 14º, 21º dias de vida.

Tabela 4.0- Pesos corporais dos ratos criados em *lactação desfavorável (LD12)*, *normal (N6)* e *lactação favorável (LF3)*, os quais foram amamentados em ninhadas formadas por 12, 6 e 3 lactentes, respectivamente (as lactantes receberam a dieta padrão para roedores [LABINA, 23% de proteína]). Um quarto grupo, desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR) foi adicionalmente estudado. Nele, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizes alimentadas com a DBR (contendo 8% de proteína). Após o desmame, todos os animais receberam a LABINA. Os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ($p=0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra na coluna da esquerda. (ANOVA+teste de Tukey).

PESO CORPORAL (g)						
Idade Grupo	7º dia	14º dia	21º dia	30º dia	60º dia	Dia do registro da DAC
N6 ^a (9)	20,0 $\pm$ 3,4	36,8 $\pm$ 2,9	56,3 $\pm$ 3,3	103,5 $\pm$ 4,7	277,8 $\pm$ 32,6	284,0 $\pm$ 15,2
LD12 ^b (7)	14,0 $\pm$ 1,4 ^a	23,4 $\pm$ 1,8 ^a	37,0 $\pm$ 3,4 ^a	77,0 $\pm$ 6,8 ^a	249,0 $\pm$ 9,2	272,4 $\pm$ 13,8
D-DBR ^c (14)	13,4 $\pm$ 1,16 ^a	16,0 $\pm$ 1,1 ^{a, b}	19,7 $\pm$ 2,5 ^{a, b}	48,5 $\pm$ 5,2 ^{a, b}	205,0 $\pm$ 19,3 ^{a, b}	210,8 $\pm$ 16,7 ^{a, b}
LF3 ^d (14)	23,3 $\pm$ 3,1 ^{a, b, c}	41,9 $\pm$ 5,0 ^{a, b, c}	63,7 $\pm$ 6,0 ^{a, b, c}	110,6 $\pm$ 8,2 ^{b, c}	296,9 $\pm$ 17,5 ^{b, c}	299,0 $\pm$ 20,6 ^{b, c}

6.2 Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical

Em todos os grupos, a aplicação tópica de KCl a 2% por 1 min foi eficaz em deflagrar a onda da DAC. Esta se propagou normalmente e foi registrada pelos dois eletrodos situados mais anteriormente no hemisfério estimulado. As figuras de 2 a 5 mostram registros eletrofisiológicos representativos para as condições nutricionais D-DBR, LD12, N6, N-*sham* e LF3, respectivamente.

Efeitos da manipulação nutricional

A manipulação precoce do estado nutricional influenciou, de maneira estatisticamente significativa, a velocidade de propagação da DAC na vida adulta, de acordo com a seguinte ordem crescente de velocidades entre os grupos experimentais: LF3 < N6 < LD12 < D-DBR. Este efeito foi evidenciado no período “pré-ECr”, tanto no hemisfério controle (não-estimulado), como no hemisfério estimulado. Estes resultados estão descritos na Tabela 5.0.

Efeitos da eletroestimulação cortical repetitiva (ECr)

No hemisfério estimulado, em todos os quatro grupos foi observado um aumento significativo da velocidade de propagação da DAC após a ECr, a julgar pelas velocidades maiores do que os respectivos valores pré-ECr no mesmo hemisfério. No hemisfério não-estimulado, as velocidades da DAC foram significativamente maiores após a ECr apenas em um dos grupos experimentais: o grupo LF3.

Os aumentos da velocidade da DAC causados pela ECr, quando expressos em percentual dos valores basais, foram significativamente maiores no hemisfério estimulado, quando comparados aos percentuais de aumento da velocidade do

hemisfério controle, ou seja as velocidades de propagação da DAC foram significativamente maiores no hemisfério estimulado, em todos os grupos experimentais, em relação aos valores do hemisfério controle após a ECr. O maior efeito da ECr foi observado no grupo N6. Esse efeito foi estatisticamente significativo quando comparado àqueles dos grupos LF3, LD12 e D-DBR.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada na velocidade de propagação da DAC nos animais *sham*, tanto nas comparações inter-hemisféricas, quanto nas comparações entre os momentos pré- e pós- ECr, que neste caso era uma estimulação fictícia (vide tópico 5.4).

Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.0 e na figura 7.0.

Análise do número de DAC espontâneas

Como anteriormente referido, em geral, a aplicação tópica de KCl a 2% por 1 min deflagrava uma única onda de DAC. No entanto, eventualmente observou-se o surgimento de episódios de DAC na ausência do estímulo químico, ou seja, sem a estimulação intencional, que era feita regularmente. Quando a incidência de DACs espontâneas é elevada, considera-se que o tecido cortical está muito susceptível ao fenômeno. Ao analisar o número de DACs espontâneas entre os grupos experimentais e os hemisférios cerebrais, observou-se uma maior incidência após a ECr no hemisfério estimulado de todos os grupos experimentais, mas não no grupo *sham* (Tabela 6).

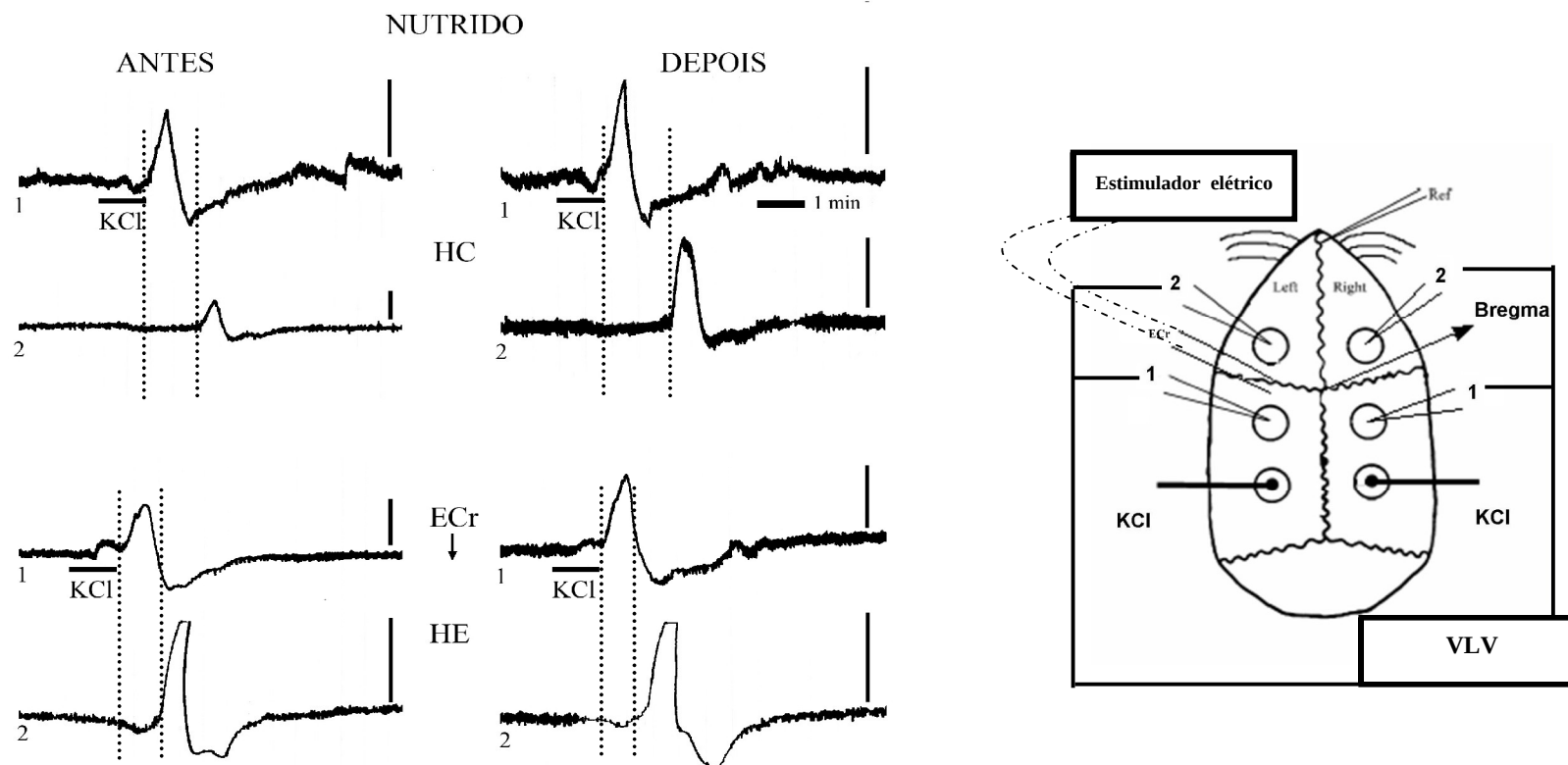


Figura 2.0 - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo nutrido (N6). Neste grupo, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizes alimentadas com a dieta “LABINA” (contendo 23% de proteína). Após o desmame, os filhotes também receberam a dieta “LABINA”. Os registros mostram a deflagração da DAC pela aplicação de KCl 2% no tempo (1 min) delimitado pelas barras horizontais nos hemisférios esquerdo e direito, e também, antes e depois da ECr. As barras de calibração verticais indicam 10 mV para a VLV (variação negativa para cima). A ilustração esquemática à direita mostra a localização dos dois orifícios de registro da DAC em cada hemisfério (eletrodos de registro 1 e 2), a localização da aplicação epidural de KCl 2% (orifício parietal posterior), o eletrodo de referência para o registro da DAC localizado sobre os ossos nasais e os eletrodos bipolares epidurais (para ECr) entre os eletrodos de registro (1 e 2) no hemisfério esquerdo.

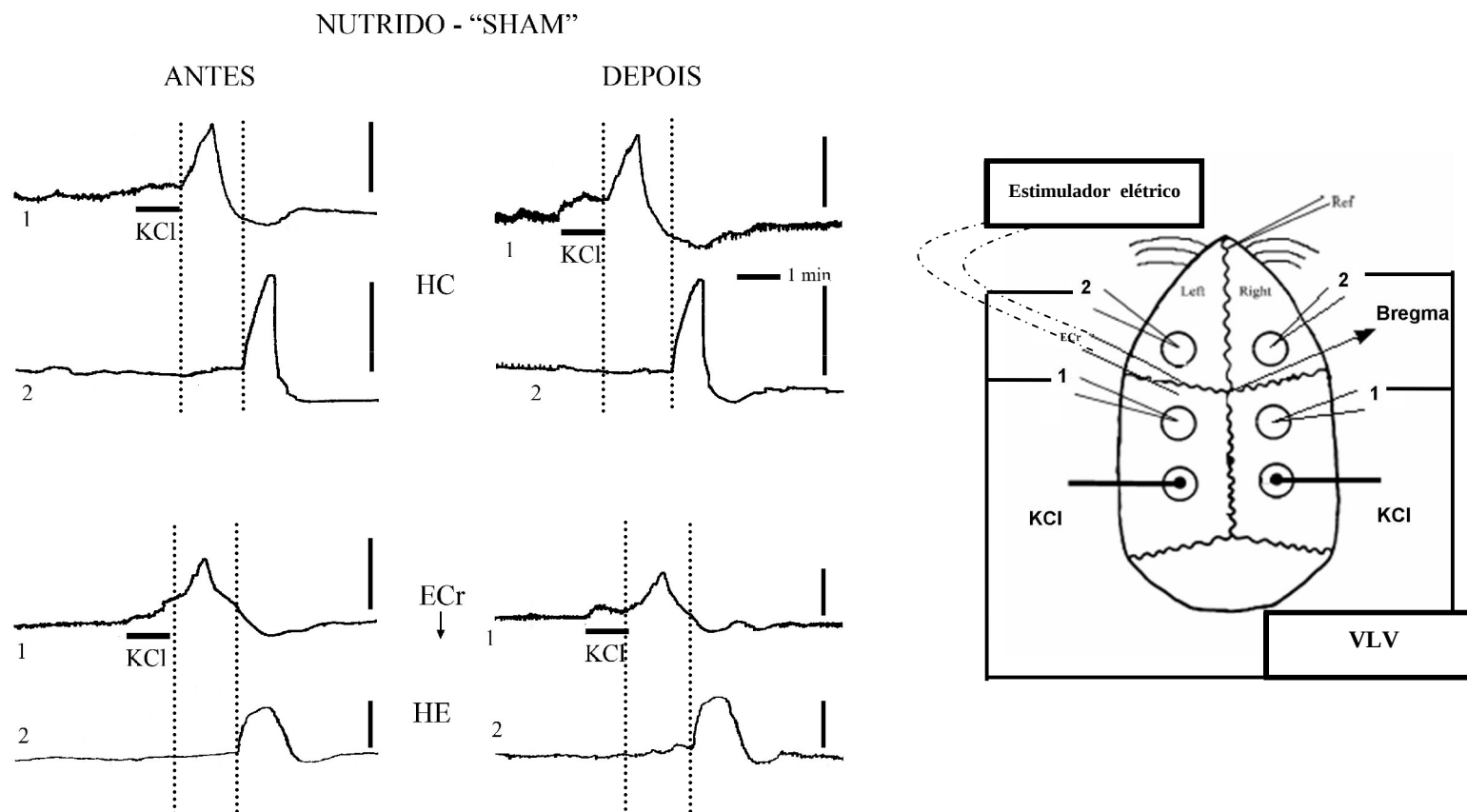


Figura 3.0 - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo N-*sham*. Neste grupo, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizas alimentadas com a dieta “LABINA” (contendo 23% de proteína). Após o desmame, os filhotes também receberam a dieta “LABINA”. Os registros mostram a deflagração da DAC pela aplicação de KCl 2% no tempo (1 min) delimitado pelas barras horizontais nos hemisférios esquerdo e direito, e também, antes e depois da ECr. As barras de calibração verticais indicam 10 mV para a VLV (variação negativa para cima). A ilustração esquemática à direita mostra a localização dos dois orifícios de registro da DAC em cada hemisfério (eletrodos de registro 1 e 2), a localização da aplicação epidural de KCl 2% (orifício parietal posterior), o eletrodo de referência para o registro da DAC localizado sobre os ossos nasais e os eletrodos bipolares epidurais (para ECr) entre os eletrodos de registro (1 e 2) no hemisfério esquerdo (eletroestimulação fictícia, *vide tópico 5.4*).

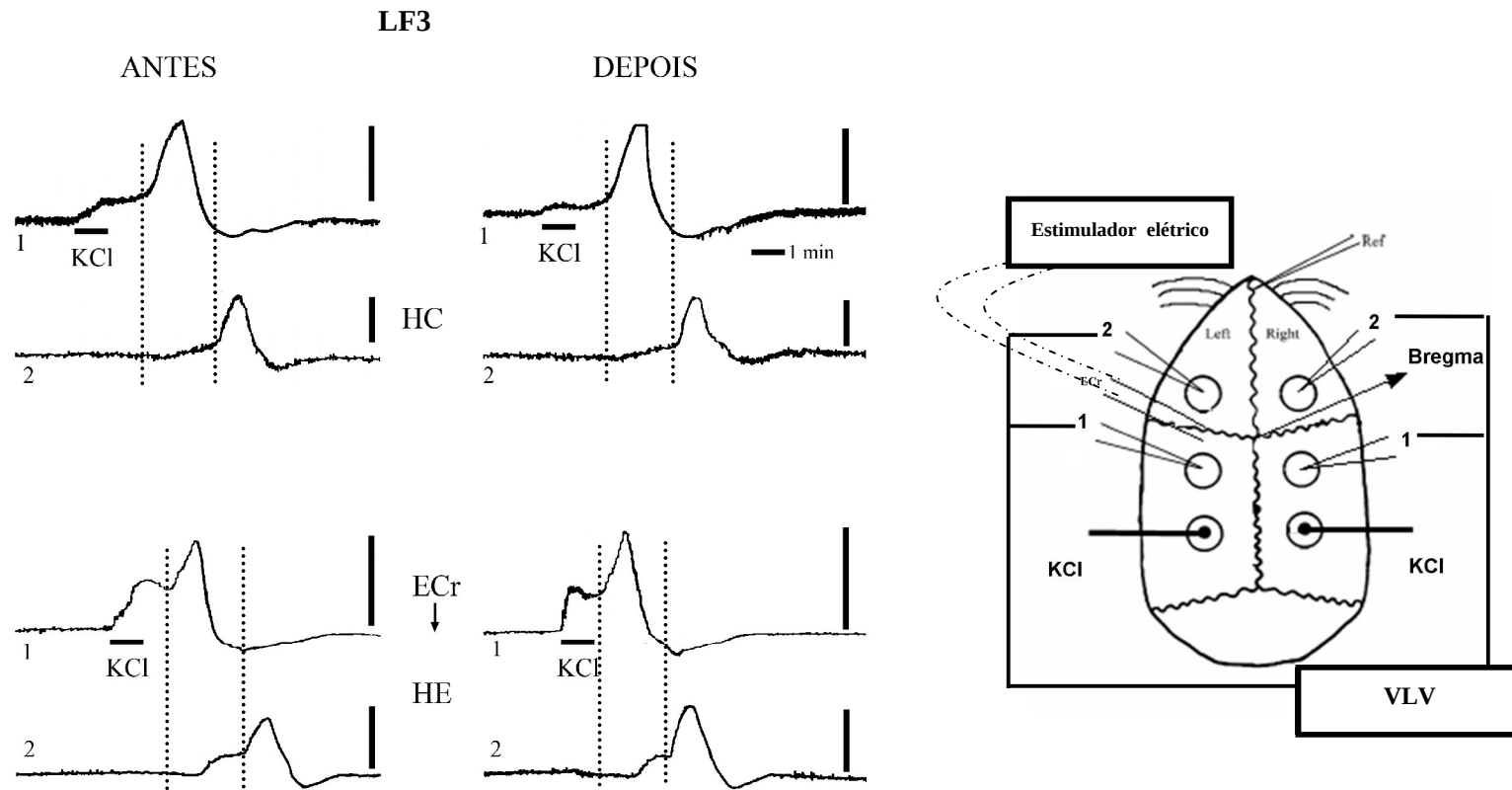


Figura 4.0 - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo experimental LF 3. Neste grupo, as ninhadas de 3 filhotes foram amamentadas por nutrízes alimentadas com a dieta “LABINA” (contendo 23% de proteína). Após o desmame, os filhotes também receberam a LABINA. O registro mostra a deflagração da DAC pela aplicação de KCl 2% no tempo (1 min) delimitado pelas barras horizontais nos hemisférios esquerdo e direito, e também, antes e depois da ECr. As barras de calibração verticais indicam 10 mV para a VLV (variação negativa para cima). A ilustração esquemática à direita mostra a localização dos dois orifícios de registro da DAC em cada hemisfério (eletrodos de registro 1 e 2), a localização da aplicação epidural de KCl 2% (orifício parietal posterior), o eletrodo de referência para o registro da DAC localizado sobre os ossos nasais e os eletrodos bipolares epidurais (para ECr) entre os eletrodos de registro (1 e 2) no hemisfério esquerdo.

LD12

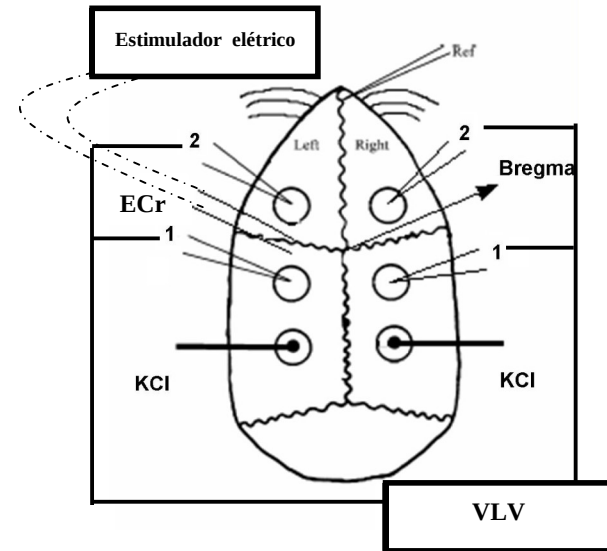
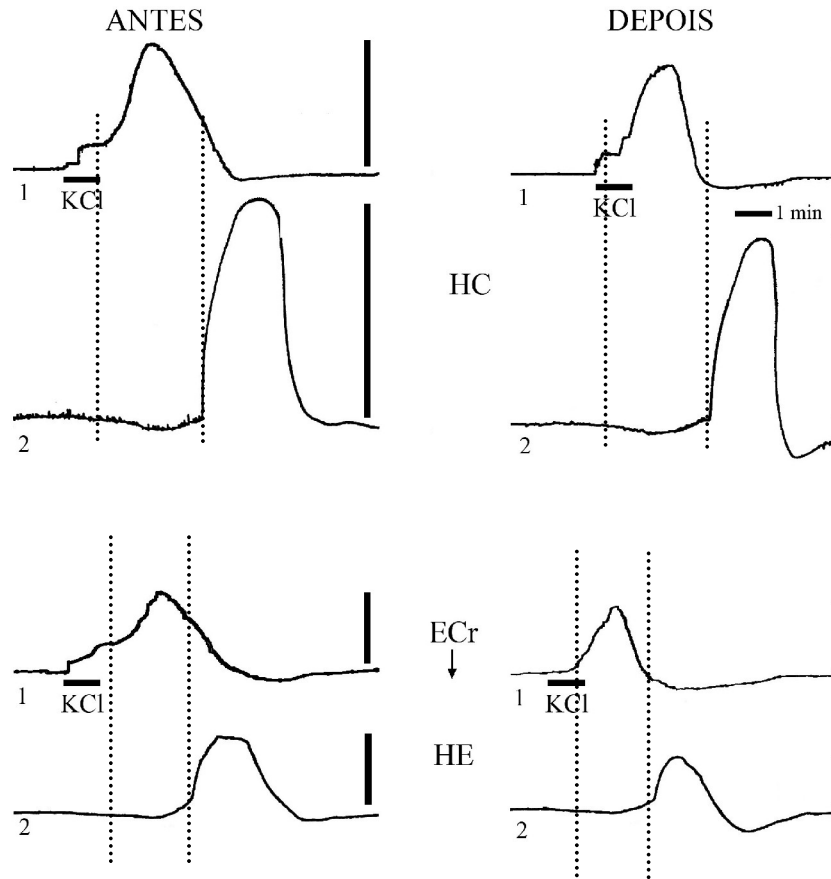


Figura 5.0 - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo experimental LD 12. Nele, as ninhadas de 12 filhotes foram amamentadas por nutrízes alimentadas com a dieta “LABINA” (contendo 23% de proteína). Após o desmame, os filhotes também receberam a dieta “LABINA”. O registro mostra a deflagração da DAC pela aplicação de KCl 2% no tempo (1 min) delimitado pelas barras horizontais nos hemisférios esquerdo e direito, e também, antes e depois da ECr. As barras de calibração verticais indicam 10 mV para a VLV (variação negativa para cima). A ilustração esquemática à direita mostra a localização dos dois orifícios de registro da DAC em cada hemisfério (eletrodos de registro 1 e 2), a localização da aplicação epidural de KCl 2% (orifício parietal posterior), o eletrodo de referência para o registro da DAC localizado sobre os ossos nasais e os eletrodos bipolares epidurais (para ECr) entre os eletrodos de registro (1 e 2) no hemisfério esquerdo.

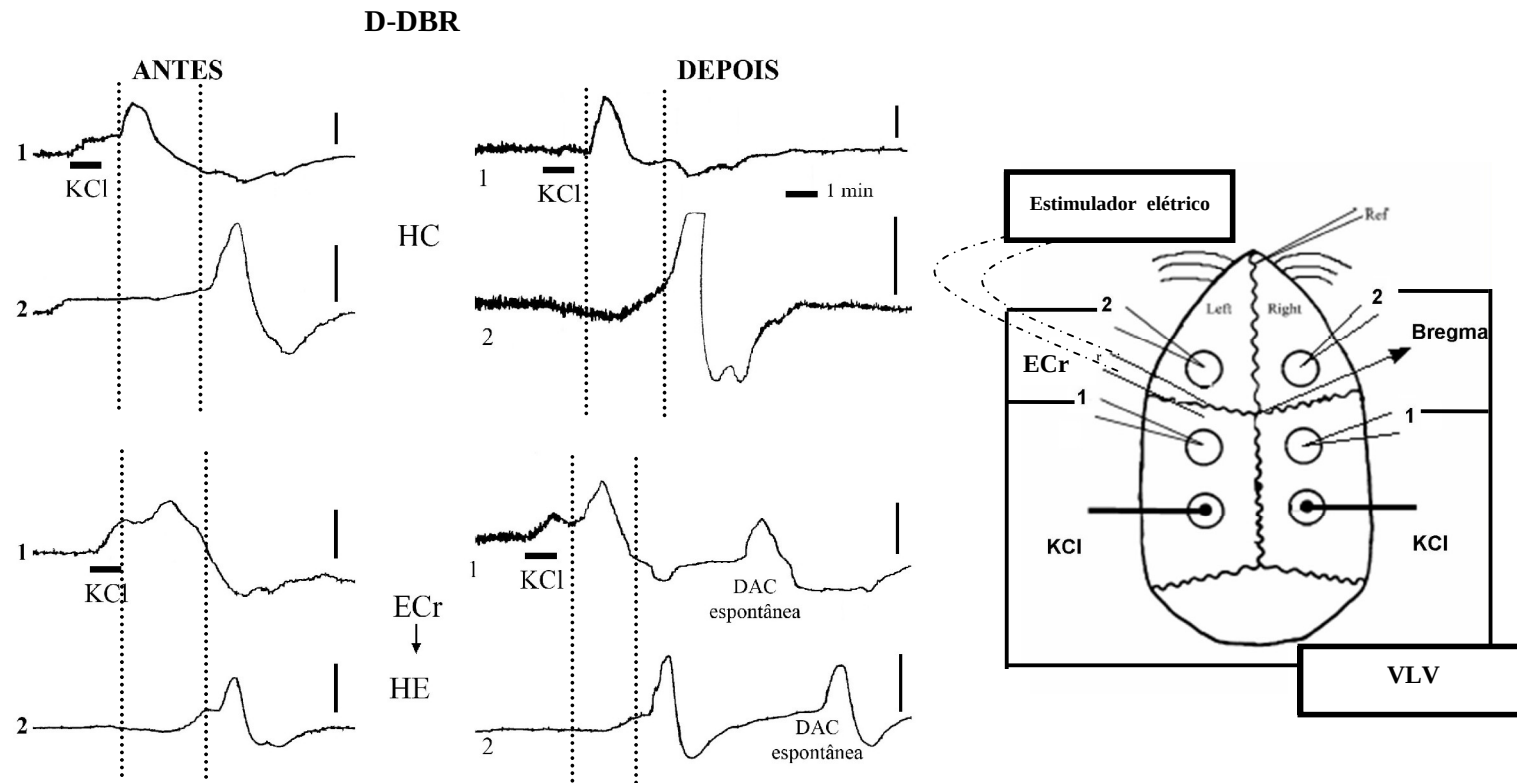


Figura 6.0 - Registros da variação lenta de tensão (VLTV) da DAC em um animal do grupo desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR). Nele, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizes alimentadas com a DBR (contendo 8% de proteína). Após o desmame, os filhotes receberam a dieta “LABINA”. O registro mostra a deflagração da DAC pela aplicação de KCl 2% no tempo (1 min) delimitado pelas barras horizontais nos hemisférios esquerdo e direito, e também, antes e depois da ECr. As barras de calibração verticais indicam 10 mV para a VLTV (variação negativa para cima). A ilustração esquemática à direita mostra a localização dos dois orifícios de registro da DAC em cada hemisfério (eletrodos de registro 1 e 2), a localização da aplicação epidural de KCl a 2% (orifício parietal posterior), o eletrodo de referência para o registro da DAC localizado sobre os ossos nasais e os eletrodos bipolares epidurais (para ECr) entre os eletrodos de registro (1 e 2) no hemisfério esquerdo.

Tabela 5.0- Velocidades médias de propagação da DAC em ratos amamentados em *lactação desfavorável (LD12)*, *lactação normal (N6)* e *lactação favorável (LF3)*, os quais eram compostos por filhotes amamentados em ninhadas formadas por 12, 6 e 3 lactentes, respectivamente, cujas lactantes receberam a dieta padrão para roedores (LABINA, 23% de proteína). Um quarto grupo, desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR) foi adicionalmente estudado. Nele, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizes alimentadas com a DBR (contendo 8% de proteína). Após o desmame, todos os animais receberam a LABINA. *Sham-* não recebeu ECr (estimulação fictícia). Os valores pré- e pós-ECr representam a média $\pm$ desvio padrão. As medidas “pós-Ecr” em % de aumento da velocidade estão apresentadas como média $\pm$ erro padrão. O número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significantemente diferentes ($p=0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra na coluna da esquerda. (ANOVA+teste de *Tukey*). * Estatisticamente diferente quando comparado ao registro basal e ^zestatisticamente diferente quando comparado ao hemisfério controle ($p=0,05$, teste *t* pareado).

Velocidades da Depressão Alastrante Cortical (mm/min)						
Grupos	Hemisfério controle (HC)			Hemisfério estimulado (HE)		
	Pré- ECr (1 e 2h)	Pós- ECr (3 e 4h)	Pós- (% Pré-ECr)	Pré- ECr (1 e 2h)	Pós- ECr (3 e 4h)	Pós- (% Pré-ECr)
N-sham (9)	3,47 $\pm$ 0,10	3,50 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,3	3,47 $\pm$ 0,11	3,49 $\pm$ 0,10	0,33 $\pm$ 0,31
N6^a (12)	3,53 $\pm$ 0,20	3,57 $\pm$ 0,19	1,40 $\pm$ 1,09	3,61 $\pm$ 0,14	4,53 $\pm$ 0,59* ^z	25,70 $\pm$ 5,05* ^z
LD 12^b (7)	3,93 $\pm$ 0,18 ^a	4,08 $\pm$ 0,29 ^a	3,89 $\pm$ 1,85	3,92 $\pm$ 0,12 ^a	4,32 $\pm$ 0,13* ^z	10,13 $\pm$ 1,70* ^{z a}
D-DBR^c (12)	4,69 $\pm$ 0,34 ^{a b}	4,64 $\pm$ 0,31 ^{a b}	-1,03 $\pm$ 0,50	4,69 $\pm$ 0,34 ^{a b}	5,30 $\pm$ 0,30* ^{z a b}	13,19 $\pm$ 1,02* ^{z a}
LF3^d (12)	3,28 $\pm$ 0,04 ^{a b c}	3,56 $\pm$ 0,17* ^{b c}	8,66 $\pm$ 1,38* ^{a c}	3,30 $\pm$ 0,05 ^{a b c}	3,78 $\pm$ 0,13* ^{z a b c}	14,65 $\pm$ 1,10* ^{z a}

Tabela 6.0 Número de DACs surgidas espontaneamente em ratos adultos previamente submetidos a condições de *lactação desfavorável (LD12)*, *normal (N6)* e *lactação favorável (LF3)*, os quais eram compostos por filhotes amamentados em ninhadas formadas por 12, 6 e 3 lactentes, respectivamente, cujas lactantes receberam a dieta padrão para roedores (LABINA, 23% de proteína). Um quarto grupo, desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR) foi adicionalmente estudado. Nele, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizas alimentadas com a DBR (contendo 8% de proteína). Após o desmame, todos os animais receberam a LABINA. *Sham*- não recebeu ECr (estimulação fictícia). Os valores representam o somatório de DACs espontâneas, dados basais (pré-ECr, 1^a. e 2^a.h de registro) e pós-ECr (3^a. e 4^a. h de registro). O número de animais em cada grupo é indicado entre parênteses, na coluna à esquerda. * Estatisticamente diferente quando comparado ao registro basal (p=0,05; ANOVA+teste de *Tukey*).

Número de DACs Espontâneas				
	Hemisferio controle		Hemisfério estimulado	
Grupos	Pré- ECr	Pós- ECr	Pré- ECr	Pós- ECr
N- <i>sham</i> (9)	2	5	5	8
N6 (12)	2	1	2	37*
Lactação desfavorável				
[D-DBR e LD12] (19)	7	12	10	39*
Lactação favorável				
LF3 (12)	3	10	12	26*

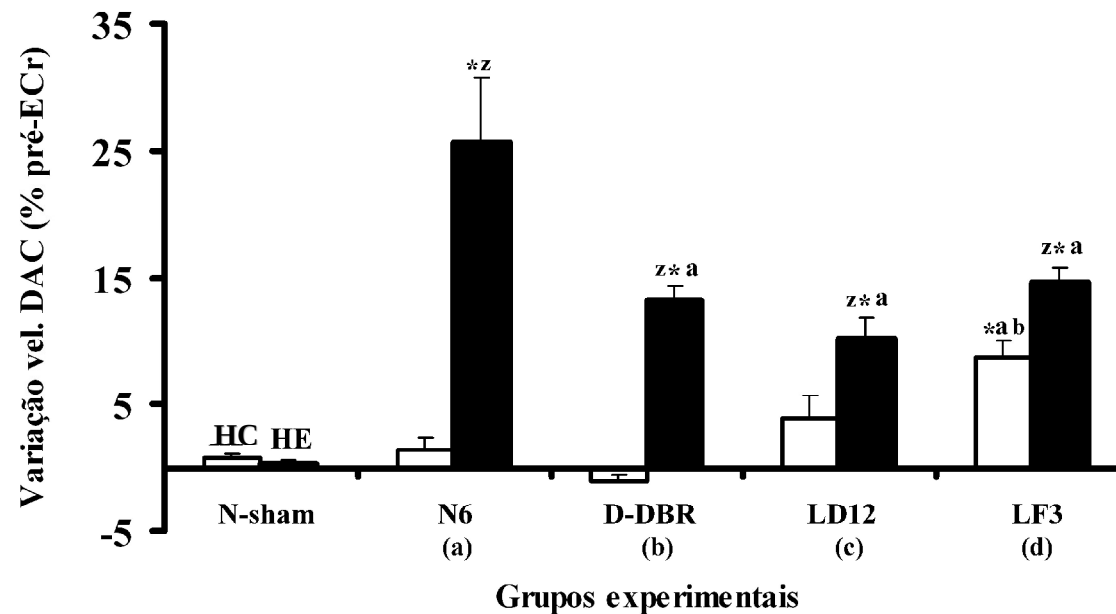


Figura 7.0 Variações das velocidades de propagação da DAC após a ECr (expressas como % do valor pré-ECr) em animais criados em *lactação desfavorável* (LD12), *lactação normal* (N6) e *lactação favorável* (LF3), estes filhotes foram amamentados em ninhadas formadas por 12, 6 e 3 lactentes, respectivamente, cujas lactantes receberam a dieta padrão para roedores (“LABINA”, 23% de proteína). Um quarto grupo, desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR) foi adicionalmente estudado. Nele, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrízes alimentadas com a DBR (contendo 8% de proteína). Após o desmame, todos os animais receberam a dieta “LABINA”. *Sham*- não recebeu ECr (estimulação fictícia). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão, As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ($p=0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra. (ANOVA+teste de *Tukey*). * Estatisticamente diferente quando comparado aos valores basais (pré-ECr) e ^z Estatisticamente diferente quando comparado aos valores do hemisfério controle ($p=0,05$, teste *t* pareado).

Os dados do presente trabalho demonstram que, no hemisfério estimulado, a eletroestimulação cortical repetitiva (ECr) foi capaz de aumentar a susceptibilidade do córtex cerebral ao fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC) em todos os grupos experimentais (N6, LD12, D-DBR e LF3), tomando-se como critério as velocidades de propagação do fenômeno. No hemisfério não-estimulado, o efeito foi observado apenas no grupo LF3. Este efeito da ECr parece depender do estado nutricional vigente durante o período de desenvolvimento rápido do encéfalo. Esses resultados serão discutidos com base nos dados da literatura. Quando pertinente, os mecanismos possíveis para explicar os efeitos observados serão apresentados.

7.1 A manipulação nutricional precoce e a evolução ponderal

O peso corporal dos diferentes grupos experimentais foi determinado, uma vez que é um bom indicador do estado nutricional global do organismo, sendo ainda de obtenção fácil e prática. A evolução ponderal dos diferentes grupos indica uma correlação entre os pesos corporais e as condições de lactação. Pode-se concluir que a “dieta básica regional”(DBR), administrada às lactantes durante o aleitamento, foi eficaz em produzir desnutrição nos filhotes. Este efeito negativo da DBR no início da vida, sobre o peso corporal, confirma resultados anteriores de diversos autores (AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 1990; BARROS *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 2002; MONTE-SILVA *et al.*, 2007; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997; TEODÓSIO *et al.*, 1990). A DBR administrada durante o aleitamento parece modificar a quantidade e a qualidade do leite materno ocasionando a deficiência nutricional nos filhotes lactentes (WANDERLEY, 2003). Segundo RASMUSSEN (1998), uma nutrição inadequada durante a lactação pode interferir na eficiência do aleitamento, pois o leite de ratas lactantes, submetidas a modelos diferentes de

desnutrição, apresenta alterações nas concentrações de proteínas e lactose. Além disso, ocorreria diminuição na quantidade produzida.

A desnutrição pelo modelo da DBR parece ser mais pronunciada do que aquela induzida pelo modelo das grandes ninhadas (12 filhotes por ninhada) a julgar pelos pesos corporais significativamente menores do grupo DBR, quando comparados ao grupo LD12. Ademais, este último grupo apresentou recuperação ponderal na idade adulta (em comparação com os controles), o que não ocorreu com o grupo D-DBR. Esse efeito do modelo de desnutrição pelas grandes ninhadas confirma resultados anteriores de ROCHA-DE-MELO *et al.* (2006) e de MAIA *et al.* (2006). A esse respeito, admite-se que, neste modelo de desnutrição, a qualidade do leite é a mesma, entretanto, a quantidade de leite recebida por cada filhote é reduzida (MORGANE *et al.*, 1978), acarretando, assim, pesos corporais menores que os filhotes amamentados em ninhadas de tamanho médio (N6) e em ninhadas pequenas (LF3).

Os pesos corporais maiores entre os animais criados em ninhadas pequenas (LF3, 3 filhotes por ninhada) corroboram resultados de outros autores acerca do impacto favorável dessa técnica sobre o ganho de peso no aleitamento (PLAGEMANN *et al.*, 1998; VELKOSKA *et al.*, 2005; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004; 2006; DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2000; DAVIDOWA *et al.*, 2002). Em relação a este resultado, é interessante ressaltar que, em roedores, a redução do número de filhotes da ninhada para apenas 3 parece representar um aumento na disponibilidade de leite materno para cada filhote, tornando-se, assim, um modelo experimental apropriado para estudar as consequências imediatas e duradouras da ingestão alimentar excessiva (IAE) durante o período pós-natal (VELKOSKA *et al.*, 2005; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004; 2006). Embora não sejam obrigados a mamar mais do que precisam, acredita-se que os recém-nascidos expostos às IAE, durante o período pós-natal, através do modelo de redução do

tamanho da ninhada (3 filhotes), apresentam hiperfagia e excesso de peso combinados com hiperglicemia, hiperinsulinemia, nível elevado de triglicerídeos e resistência à insulina (PLAGEMANN et al., 1999). Tais fatores explicariam o aumento de peso corporal observado nesses ratos, no presente estudo.

7.2 Alteração precoce do estado nutricional e a depressão alastrante cortical (DAC)

O efeito da manipulação precoce do estado nutricional sobre a propagação da DAC será discutido comparando-se os resultados das duas primeiras horas do registro eletrofisiológico realizado em ambos os hemisférios cerebrais (controle e estimulado), por se tratar do período anterior a eletroestimulação cortical. Os ratos criados em ingestão alimentar excessiva (IAE, grupo LF3) apresentaram velocidades significativamente menores, em ambos os hemisférios de registro, quando comparados aos animais nutridos (N6). Essa resistência à propagação da DAC encontrada no grupo LF3 confirma achados anteriores (ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Por outro lado, as velocidades de propagação da DAC nos ratos dos grupos LD12 e D-DBR foram significativamente maiores do que os ratos N6. Estes resultados, que indicam uma maior susceptibilidade à DAC em ratos desnutridos precocemente, também corroboram resultados anteriores, seja em animais desnutridos pelo modelo das grandes ninhadas (ROCHA-DE-MELO et al., 2006; FRAZÃO et al., 2004), seja pela desnutrição ocasionada pelo consumo de DBR pela lactante (GUEDES et al., 1987a; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; MONTE-SILVA et al., 2007).

Além de confirmarem achados anteriores, estes resultados evidenciam, mais uma vez, a sensibilidade do córtex cerebral à nutrição inadequada durante o aleitamento. Este, como se sabe, constitui no rato o “período crítico” ou de maior vulnerabilidade do

sistema nervoso a agressões externas, representadas neste trabalho pela deficiência nutricional (DOBBING, 1968) ou pelo excesso alimentar (PLAGEMANN *et al.*, 1999).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a maior susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC em ratos desnutridos. Dentre esses mecanismos, tem-se a mielinização deficiente, a maior densidade do “empacotamento” celular e alterações, tanto na proporção neurônio/glia, como em sistemas de neurotransmissores e do metabolismo energético, provocados pela desnutrição precoce (De LUCA *et al.*, 1977; GUEDES *et al.*, 1987a; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006).

Como descrito anteriormente para os pesos corporais, o modelo de desnutrição pela DBR parece exercer efeitos mais robustos, com relação aos parâmetros eletrofisiológicos, quando comparados ao modelo de desnutrição pelas grandes ninhadas, a julgar pelas velocidades significativamente maiores no grupo D-DBR. A esse respeito, pode-se sugerir que a desnutrição pela DBR durante o aleitamento afeta o desenvolvimento do sistema nervoso de uma maneira mais agressiva que a desnutrição imposta pelo modelo das grandes ninhadas, em que a lactante é alimentada com a dieta de manutenção do biotério.

Os mecanismos descritos acima, relacionados aos efeitos da desnutrição sobre a DAC, deixam de ser aprofundados no presente estudo, uma vez, que isto pode ser encontrado em estudos anteriores (De LUCA *et al.*, 1977; GUEDES *et al.*, 1987a; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006). Igualmente, não se pretende detalhar os mecanismos responsáveis pelos efeitos da ingestão alimentar excessiva sobre a DAC, os quais também podem ser encontrados em estudos anteriores (ROCHA-DE-MELO, 2001; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006). Contudo, é

relevante destacar a coerência dos presentes resultados com aqueles dos trabalhos prévios.

Com relação aos efeitos das IAE sobre a DAC, caracterizados pelo aumento da resistência cortical à sua propagação, pode-se sugerir a participação de um outro mecanismo possivelmente relacionado a este efeito. SANTOS-MONTEIRO *et al.* (2000) e MONTE-SILVA *et al.*, (2007) demonstraram uma redução na susceptibilidade cortical à DAC em ratos submetidos à estimulação multi-sensorial e à eletroestimulação periférica (estimulação da via somestésica), respectivamente, durante o aleitamento. A redução da ninhada para apenas 3 filhotes poderia aumentar o tempo materno dedicado aos cuidados de cada lactente, o que representaria mais estimulação sensorial do filhote. Esse fator poderia contribuir para aumentar a resistência à propagação da DAC. No entanto, essa hipótese precisa ser futuramente investigada.

7.3 Eletroestimulação cortical repetitiva (ECr), alteração precoce do estado nutricional e depressão alastrante cortical (DAC)

Este ponto representa o aspecto pioneiro desta dissertação, a primeira a abordá-lo experimentalmente. A ECr foi capaz de aumentar a susceptibilidade cerebral ao fenômeno da DAC em todos os grupos experimentais (N6, LD12, D-DBR e LF3), no hemisfério estimulado, sendo este efeito maior no grupo N6. No hemisfério não-estimulado, contudo, o efeito da ECr foi observado apenas no grupo LF3, conforme descrito previamente. É, pois, razoável sugerir que este efeito da ECr parece depender da condição nutricional no aleitamento e do hemisfério cerebral analisado.

O aumento na susceptibilidade à DAC não pode ser atribuído à mera presença dos eletrodos epidurais de aplicação da ECr, uma vez que nas duas horas iniciais do registro (“registro basal”) as velocidades de propagação da DAC permaneceram sem variações

significantes. Isso também ocorreu, durante todo o registro, nos animais “sham”, que receberam os eletrodos corticais, mas não sofreram ECr (estimulação fictícia, vide tópico 5.4 da metodologia). Este resultado confirma os dados encontrados em trabalho anterior (FREGNI *et al.*, 2005), que analisou apenas animais normonutridos. Segundo esses autores, a ECr parece aumentar a excitabilidade cerebral, a julgar pela velocidade de propagação da DAC aumentada, efeito este que foi também detectado duas semanas após a ECr.

No presente trabalho, os resultados com a análise do número de DACs espontâneas são favoráveis aos efeitos da ECr sobre a velocidade de propagação da DAC. Conforme descrito anteriormente, quando a incidência de DACs espontâneas é elevada, considera-se que o tecido cortical está muito susceptível ao fenômeno, à semelhança do aumento na velocidade de propagação do fenômeno. Diante disso, pode-se inferir que, o número de DACs espontâneas também pode ser sugerido como um indicador dos efeitos da ECr sobre a excitabilidade cortical a julgar pela maior incidência de DACs espontâneas após a ECr no hemisfério estimulado de todos os grupos experimentais.

Alguns mecanismos poderiam explicar estas modificações na susceptibilidade à DAC. A esse respeito, é interessante mencionar que, embora os efeitos clínicos da eletroestimulação cortical já estejam bem demonstrados, pouco é conhecido sobre seus mecanismos de ação. Alguns autores têm destacado a importância clínica da utilização desta técnica no tratamento de distúrbios que envolvam a diminuição da excitabilidade cerebral, como acidentes vasculares cerebrais, depressão maior e doença de *Parkinson* (BENABID, 2003; FREGNI e PASCUAL-LEONE, 2007). Nestes casos, admite-se que o benefício terapêutico seja devido ao aumento na excitabilidade cortical que a ECr parece provocar. Nesse sentido, estudos experimentais têm demonstrado que a DAC

representa um instrumento de avaliação da excitabilidade cortical (FREGNI *et al.*, 2005; 2007; LIEBETANZ *et al.*, 2006).

A excitabilidade cortical pode ser considerada como sendo dependente do equilíbrio fisiológico de íons e neurotransmissores no tecido nervoso (LENT, 2004). A DAC, por sua vez, pode ser afetada pela alteração de sistemas de neurotransmissores, bem como por modificações de concentrações iônicas (GUEDES *et al.*, 1992; GUEDES *et al.*, 2002 e AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006; GUEDES *et al.*, 1988; GUEDES e Do CARMO, 1980). Segundo MARTINS-FERREIRA *et al.*, (2000), a DAC decorre de uma cascata de mecanismos interligados que envolvem o acoplamento de eventos fisiológicos encontrados nos meios extracelular e intracelular, e ainda, o funcionamento conjunto de populações celulares via junções do tipo *gap*. Diante do exposto, pode-se observar que a DAC atuaria como um indicador do balanceamento entre íons e neurotransmissores, excitatórios e inibitórios.

Os astrócitos têm sido considerados responsáveis, dentre outras funções, pelo suporte nutricional e ambiental dos neurônios. Estudos experimentais têm demonstrado que os astrócitos se comunicam ativamente e são capazes de modular a atividade neuronal através da liberação de cálcio (NEDERGAARD, 1994). O cálcio liberado pelos astrócitos parece ser responsável pela modulação da transmissão sináptica excitatória e inibitória. As “ondas” de migração deste cálcio pelo tecido nervoso são fundamentais para a função encefálica. É interessante destacar que elas, por sua vez, apresentam características de deflagração e de propagação semelhantes à DAC (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000). Segundo esses autores, o estímulo elétrico é capaz de desencadear uma onda de liberação de cálcio pelos astrócitos e este mesmo estímulo também é capaz de deflagrar uma onda de propagação da DAC.

É conhecido que a propagação da DAC é acompanhada pela redução dos níveis de cálcio extracelular. Este cálcio seria regulado pelos astrócitos e a despolarização secundária provocada nos neurônios vizinhos levaria à liberação de K^+ e glutamato, o que, por sua vez, aumentaria, posteriormente a concentração de Ca^{++} citosólico, constituindo um possível mecanismo de retro-alimentação para a propagação auto-mantida da DAC (LEIBOWITZ, 1992; NEDERGAARD, 1994; MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000). Mudanças nas células gliais estão relacionadas à reorganização sináptica, que ocorre em resposta à atividade neuronal (WILSON *et al.*, 1990). De acordo com essa idéia, a ECr aumentaria a susceptibilidade à DAC, não só modificando a atividade neuronal, como também induzindo mudanças na neuroglia (FREGNI *et al.*, 2005). É razoável sugerir que a ECr influenciaria a manutenção dos níveis de Ca^{++} relacionados à atividade glial e capazes de participar da propagação da DAC.

Outra possível explicação para o aumento da excitabilidade cortical após aplicação da ECr, a julgar pelo o aumento na susceptibilidade à DAC, seria a modificação da “eficiência sináptica” (GUEDES *et al.*, 2005; FUETA *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que a eletroestimulação cortical repetitiva pode induzir ou uma potenciação a longo prazo, ou uma depressão a longo prazo da transmissão sináptica, a depender das condições experimentais (FREGNI *et al.*, 2005; FUETA *et al.*, 1998). A potenciação a longo prazo poderia ser um outro mecanismo provavelmente envolvido no aumento da susceptibilidade à DAC provocado pela ECr. HERRY *et al.* (1999) demonstraram que a estimulação elétrica de baixa frequência (2 Hz) está associada com uma depressão imediata e uma potenciação tardia significativa da transmissão sináptica.

Em relação à participação dos sistemas de neurotransmissores no efeito da ECr sobre à DAC, é interessante mencionar que GUEDES *et al* (1992) e GUEDES &

CAVALHEIRO (1997) demonstraram que o uso do agonista GABAérgico, Diazepam, facilita a propagação da DAC, enquanto o uso dos antagonistas GABAérgicos bicuculina e Picrotoxina (GUEDES et al 1992), a reduz. GUEDES e FRADE (1993) e mais recentemente BEZERRA *et al.* (2005) mostraram que o aumento do consumo de etanol, que, por sua vez, parece exacerbar as ações eletrofisiológicas do GABA, também aumenta a susceptibilidade cortical à DAC. Por outro lado, o uso do antagonista de aminoácidos excitatórios (MK-801, antagonista do tipo NMDA [*N*-metil-*D*-aspartato]) dificulta a propagação da DAC (GUEDES *et al.*, 1988). Mecanismos opióides também parecem estar envolvidos na propagação da DAC. GUEDES *et al.* (1987b) demonstraram um efeito antagônico, sobre o início e a propagação da DAC, do naloxone, seja aplicado topicamente, intra-peritonalmente ou através de microiontoforese. Além destes neurotransmissores, a serotonina também parece estar envolvida na propagação da DAC, pois o aumento da atividade serotoninérgica parece dificultar a propagação da DAC (CABRAL-FILHO *et al.*, 1995; GUEDES *et al.*, 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006).

Como foi observado um aumento da velocidade de propagação da DAC após a aplicação da ECr, é tentador pensar que a ECr atue estimulando mecanismos GABAérgicos e/ou diminuindo a atividade opióide e/ou serotoninérgica, conforme descrito acima acerca dos efeitos destas modificações sobre a DAC, entretanto, investigações posteriores serão necessárias para analisar a associação de tais mecanismos propostos para o efeito da ECr sobre a susceptibilidade à DAC.

Por outro lado, a DAC é acompanhada pelo aumento do K^+ e diminuição do Na^+ , Ca^{+2} e Cl^- extracelulares, variação do volume extracelular e mudanças bifásicas do pH, iniciando com uma pequena e breve alcalinização, seguida de uma acidificação de

maior duração (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000; FERREIRA-FILHO e MARTINS-FERREIRA, 1992). Há várias evidências experimentais sobre o movimento de íons e variações metabólicas em diferentes regiões do sistema nervoso central durante a DAC. Estes estudos estão principalmente relacionados à demanda energética do tecido nervoso necessária para o re-establishimento do equilíbrio iônico das membranas celulares após as mudanças causadas pela passagem da DAC (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000). Assim, condições nutricionais adversas durante o aleitamento, ao afetar o desenvolvimento neural, poderiam comprometer as respostas cerebrais a demandas, como a representada pela ECr, no período pós-desmame. Em consonância com essa idéia, foi observado no presente trabalho que o aumento na velocidade de propagação da DAC, após a ECr, no grupo nutrido (N6) foi maior que nos outros grupos. Entretanto, não houve diferença significativa entre eles com relação ao aumento na velocidade de propagação da DAC.

Embora a técnica de eletroestimulação tenha exercido efeito semelhante no hemisfério estimulado, nos grupos LF3, LD12 e D-DBR, as velocidades de propagação da DAC após a ECr continuaram significativamente diferentes, de acordo com a seguinte ordem crescente: LF3 < LD12 < D-DBR. Por outro lado, sabe-se que as técnicas de eletroestimulação cerebral, como estimulação magnética transcraniana, (EMTr), estimulação transcraniana com corrente direta (ETCD) e eletroestimulação cortical repetitiva epidural (ECr) estão sendo utilizadas como abordagem terapêutica para o tratamento de distúrbios envolvidos com alterações na excitabilidade cortical, como, epilepsia, acidentes vasculares cerebrais, depressão maior e doença de *Parkinson* (FREGNI e PASCUAL-LEONE, 2007). Portanto, é tentador inferir que diante da escolha destas técnicas como abordagem terapêutica seria interessante investigar o estado nutricional precoce antes de determinar os parâmetros da estimulação elétrica.

Embora o efeito seja semelhante, o resultado final pode ser diferente e este, por sua vez, pode interferir nos objetivos terapêuticos destas técnicas.

Ainda em relação às associações entre o estado nutricional precoce (aleitamento) e os efeitos da ECr sobre a DAC, deve-se discutir os efeitos desta técnica de eletroestimulação em animais criados em condições favoráveis de lactação. Nestes animais (grupo LF3), o efeito da ECr sobre a DAC, não se restringiu ao hemisfério estimulado, aumentando significativamente a susceptibilidade à DAC no hemisfério contra-lateral. É conhecido que a comunicação inter-hemisférica influencia a propagação da DAC (PINTO e GUEDES, 2008). Conforme descrito anteriormente, a ECr parece aumentar a excitabilidade cortical aumentando a eficácia sináptica e influenciando a atividade da neuroglia. É tentador sugerir que animais criados em condições favoráveis de lactação poderiam apresentar um número maior de células gliais e/ou uma maior mielinização, o que poderia “facilitar” os efeitos da ECr sobre a excitabilidade cortical e consequentemente sobre a velocidade da DAC. Entretanto, serão necessárias investigações posteriores para analisar tais mecanismos propostos acerca das associações entre o estado nutricional precoce e os efeitos da ECr sobre a DAC.

Diante do exposto, é razoável sugerir que o estado nutricional (ingestão alimentar excessiva ou deficiente) parece influenciar o efeito da ECr sobre a excitabilidade cortical.

8.0 CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que:

- A manipulação das condições de aleitamento, seja pelo uso materno da DBR, seja pela variação do tamanho da ninhada, foi eficaz em afetar o desenvolvimento corporal da prole, a julgar pelas alterações ponderais detectadas, em alguns casos durante todo o período experimental, corroborando achados anteriores;
- Os animais desnutridos apresentaram uma maior susceptibilidade à propagação da DAC, enquanto que nos animais criados com uma ingestão alimentar excessiva (IAE) na lactação (LF3) ocorreu o contrário, conforme observado em trabalhos prévios.
- A eletroestimulação cortical repetitiva (ECr) foi capaz de aumentar a susceptibilidade cerebral ao fenômeno da DAC em todos os grupos experimentais, no hemisfério estimulado, sendo o maior efeito da ECr observado no grupo normonutrido (N6);
- No hemisfério não-estimulado, o efeito da ECr foi observado apenas no grupo amamentado em condições favoráveis (IAE, ninhadas pequenas; grupo LF3);
- O estado nutricional (ingestão alimentar excessiva e deficiente durante a lactação) pode influenciar o efeito da ECr sobre a susceptibilidade cerebral à DAC.

9.0 PERSPECTIVAS

Evidências clínicas têm demonstrado a eficácia da estimulação encefálica não invasiva em várias condições neurológicas; entretanto os seus mecanismos de ação ainda não estão bem definidos. O presente trabalho demonstra a utilização experimental da depressão alastrante cortical como instrumento de avaliação dos efeitos de técnicas de eletroestimulação encefálica sobre a excitabilidade cerebral. Além disso, este estudo alerta, de maneira pioneira, para a possibilidade de alterações nos efeitos da eletroestimulação cortical repetitiva (ECr), quando associada à condição nutricional imposta durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso. Assim, algumas perspectivas são sugeridas para a continuidade do presente estudo:

- Investigar os efeitos da combinação de técnicas diferentes de eletroestimulação encefálica sobre a propagação da DAC;
- Estudar a associação dos efeitos da combinação de técnicas de eletroestimulação encefálica com o estado nutricional imposto no início da vida sobre a propagação da DAC;
- Avaliar as possíveis diferenças regionais corticais, no que se refere aos efeitos da ECr sobre a DAC;
- Analisar os efeitos da ECr sobre características comportamentais do animal;
- Caracterizar os efeitos de uma “curva frequência-resposta” de ECr sobre a propagação da DAC;
- Avaliar os efeitos da ECr sobre a DAC utilizando fármacos, para testar o envolvimento dos sistemas glutamatérgico, GABAérgico, dopaminérgico, de opióides e serotoninérgico, nos mecanismos neuroquímicos associados a esse efeito;

10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, SS; DUNTAS, LH; DYE, L; NUNES, ML; PRASAD, C; ROCHA, JBT; WAINWRIGHT, P; ZAIA, CTBV; GUEDES, RCA (2002). Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr. Neurosci.* 5, 311–320.
2. AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, PCF; LIMA, DSC; OZIAS, MG; OLIVEIRA, MB; GUIMARÃES, NX; GUEDES, RCA (2006). Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experimental Neurology* 200:275-282.
3. ANDRADE, AFD; GUEDES, RCA e TEODÓSIO, NR (1990) Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23, 889–893.
4. BATISTA-FILHO M e RISSIN A (2003) Transição Nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(Sup. 1):S181-S191.
5. BATISTA-FILHO M; LIMA EJ; DA COSTA MFTV; ANDRADE-LIMA H; MARTINS MHS; BAZANTE MO; NASCIMENTO JS; DANTAS LYS; MADRUGA MIL; VIEIRA R; REIS FM; MARTINS GC; VARELA RM; GOMES SMF; LINHARES ER (1968). Pesquisa Nutricional na Zona da Mata. Recife, Universidade Federal de Pernambuco.
6. BARROS KM; MANHÃES-DE-CASTRO R; LOPES-DE-SOUZA S; MATOS RJ; DEIRÓ TC; CABRAL-FILHO JE; CANON F. (2006) A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexs and lcomotor activity in rats. *Nutr. Neurosci* 9 (1-2): 99-104.
7. BENABID, AL (2003) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 13,696-706.
8. BEZERRA RS; ABADIE-GUEDES R; MELO FRM; PAIVA AMA; AMÂNCIO-DOS-SANTOS AA; GUEDES RCA (2005) Shrimp carotenoids protect the developing rat

- cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression
Neuroscience Letters 391 51–55;
9. BOËX C , VULLIE'MOZ S; SPINELLI L; POLLO C; SEECK M. (2007) High and low frequency electrical stimulation in non-lesional temporal lobe epilepsy. *Seizure* 16, 664—669
 10. BURT, T; LISANBY, SH & SACKEIM, HA (2002) Neuropsychiatric applications of transcranial magnetic stimulation: a meta analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*, 5, 73-103.
 11. CABRAL-FILHO, JE; TRINDADE-FILHO, EM; GUEDES, RCA. (1995) Effect of d-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 347-350.
 12. COSTA-CRUZ, RRG. e GUEDES, RCA. (2001) Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neuroscience Letters* 303, 177–180.
 13. DAVIDOWA H & PLAGEMANN A (2000). Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. *Neuroscience Letters* 293: 21-24.
 14. DAVIDOWA H; LI Y; PLAGEMANN A (2002). Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. *Regulatory Peptides* 108: 103–111.
 15. DAVIDOWA H; Li. Y; PLAGEMANN A (2003). Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur. J. Neurosci* 18: 613-621.
 16. DE LUCA B; CIOFFI LA; BURES J (1977). Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nervosa Superior* 19:130-131.
 17. DOBBING J. (1968). Vulnerable periods in developing brain. In: Davison AN, Dobbing J. *Applied neurochemistry*. Oxford: Blackwell, 287-316.

18. EL-BACHÁ, R.S., LIMA-FILHO, J.L. e GUEDES, R.C.A. (1998) Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. *Nutritional Neuroscience* 1, 205–212.
19. FERREIRA-FILHO CR; MARTINS-FERREIRA H (1992). Interstitial fluid pH and its changes during spreading depression in isolated chick retina. In do Carmo, R.J. (Ed.), *Experimental Brain Research Series Vol. 23: Spreading Depression* Springer, Berlin, pp. 75–88.
20. FRAZÃO MF (2004) Depressão Alastrante Cortical em Ratos Adultos Tratados com L-Arginina durante o Aleitamento. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.
21. FREGNI, F, MONTE-SILVA, KK, OLIVEIRA, MB, FREEDMAN, SD, PASCUAL-LEONE, A, GUEDES, RCA. (2005). Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2278–2284.
22. FREGNI F.; LIEBETANZ D.; MONTE-SILVA K. K., BATISTA-DE-OLIVEIRA M.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS A.; NITSHE M. A.; PASCUAL-LEONE, A; GUEDES R C.A (2007). Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Experimental neurology*, 204:462-6.
23. FREGNI F; PASCUAL-LEONE A. (2007) Technology Insight: noninvasive brain stimulation in neurology — perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nature Clinical Practice* 3: 383-393.
24. FUETA Y; OHNO K; MITA T (1998). Large frequency potentiation induced by 2 Hz stimulation in the hippocampus of epileptic El mice. *Brain Research* 792: 79-88.
25. GALANOPOULOU AS e MOSHÉ S L (2002). Desnutrição e epilepsia. *Jornal de Pediatria* - Vol. 78, Nº1.
26. GORJI A (2001) Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Research Reviews* 38 33–60.

27. GRANTHAM-MCGREGOR, S (1995). A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *J. Nutr.* 125, 2233S–2238S.
28. GRANTHAM-MCGREGOR, SM; LIRA, PIC; ASHWORTH, A; MORRIS, SS; ASSUNÇÃO, AMS (1998). The development of low birth weight term infants and the effects of the environment in Northeast Brazil. *J. Pediatr.* 132, 661–666.
29. GRANTHAM-McGREGOR SM (1990) Malnutrition, Mental function, and Development. *The Malnourished Child Nestlé Nutrition Workshop Series*, vol 19. pp 197-212.
30. GUEDES, RCA e Do CARMO, RJ (1980) Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Experimental Brain Research* 39, 341–349.
31. GUEDES, RCA; ANDRADE, AFD e CABRAL-FILHO, JE (1987a) Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effects of dietary protein deficiency. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 20, 639–642.
32. GUEDES RCA; AZEREDO FAM; HICKS TP; CLARKE RJ; TASHIRO T (1987b). Opioid mechanisms involved in the slow potential change and neuronal refractoriness during cortical spreading depression. *Exp. Brain Res* 69: 113-118.
33. GUEDES, RCA; ANDRADE, AFD e CAVALHEIRO, EA (1988) Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In Cavaleiro, E.A., Lehman, J. and Turski, L. (Eds.), *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research* . Alan R. Liss, New York, pp. 667–670.
34. GUEDES R.C.A. e BARRETO, J.M. (1992) Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25, 393–397.
35. GUEDES, R.C.A., CABRAL-FILHO, J.E. e TEODÓSIO, N.R. (1992) GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. In do Carmo, R.J. (Ed.), *Experimental Brain Research Series Vol. 23: Spreading Depression* Springer, Berlin, pp. 17–26.
36. GUEDES RCA e FRADE SF (1993) Effect of ethanol on cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26: 1241-1244.

37. GUEDES, RCA e PEREIRA-DA-SILVA, MS (1993) Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26: 1123–1128.
38. GUEDES, RCA; AMORIM, LF; TEODÓSIO, NR (1996). Effect of aging on cortical spreading depression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1407-1412.
39. GUEDES, RCA; AMANCIO-DOS-SANTOS, A; MANHÃES-DE-CASTRO, R; COSTA-CRUZ, R.R.G. (2002) Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*, 5(2):115-123.
40. GUEDES RCA (2005) Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: "Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field", Liebermann, H., Kanarek, R. and Prasad, C. (Eds.), CRC Press, New York. *Nutrition, Brain and Behavior Series*, volume 3, chapter 4, pages 39-54.
41. GUEDES RCA e CAVALHEIRO E (1997). Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy research*, 27: 33-40.
42. GUEDES, RCA, TSURUDOME, K, MATSUMOTO, N. (2005) Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. *Brain Research*, 1036, 109-114.
43. HERRY, C; VOUMBA, RM e GARCIA, R (1999) Plasticity in the mediodorsal thalamo-prefrontal cortical transmission in behaving mice. *J. Neurophysiol.*, 82, 2827–2832.
44. JACOME DE (2001) Hypoglycemia Rebound Migraine Headache: *The Journal of Head and Face Pain* 41 (9) , 895–898.
45. KOHN M e BOOTH M. (2003). The worldwide epidemic of obesity in adolescents. *Adolesc Med* 14: 1–9.
46. LAURITZEN M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory, *Brain* 117 (Pt. 1) 199–210.
47. LEÃO, AAP (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiology*, 7:359-390.

48. LEÃO, AAP (1947). Further observations on the spreading depression of activity in cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, **10**:409-414.
49. LEÃO, AAP (1972). Spreading depression. In: D.P. Purpura, K. Penry, D.B. Tower, D.M. Woodbury & R.D. Walter (Eds.) *Experimental Models of epilepsy*. Raven Press, N. York, p.173-195.
50. LEHMENKÜHLER, A; GROTEMEYER, KH e TEGTMEIER, F (1993). *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment* Urban and Schwarzenberg, Munich.
51. LEIBOWITZ, DH (1992) The glial spike theory. I. On an active role of neuroglia in spreading depression and migraine. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 250, 287–295.
52. LENT, R. Cem bilhões de neurônios conceitos fundamentais de neurociência. Ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2004.698p.
53. LIEBETANZ D; FREGNI F; MONTE-SILVA KK; BATISTA-DE-OLIVEIRA M; AMÂNCIO-DOS-SANTOS A; NITSHE MA; GUEDES RCA (2006). After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression *Rev.Neuroscience Letters*, Vol 398 pp 85-90.
54. MAEDA F; KEENAN JP; TORMOS JM; TOPKA H; PASCUAL-LEONE A. (2000) Modulation of corticospinal excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol*;111:800-5.
55. MAIA LMSS; FRAZÃO MF; SOUZA TKM; SILVA MB; ROCHA-DE-MELO AP; PICANÇO-DINIZ CW; AMÂNCIO-DOS-SANTOS A; GUEDES RCA (2006). L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. *Brain Research* 1072: 19-25.
56. MARTINS-FERREIRA H; NEDERGAARD M; NICHOLSON C; (2000). Perspectives on spreading depression. *Brain Research Reviews* 32: 215-234.
57. McMILLEN CI; ADAM CL; MÜHLHÄUSLER BS (2005) Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J. Physiol* 565.1: 9-17.
58. MONTE-SILVA, KK; ASSIS, FLN; LEAL, GMA and GUEDES, RCA (2007) Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on

- cortical spreading depression in weaned rats. *Nutritional Neuroscience*, 10:3, 187 – 194.
59. MORGANE, PJ; MILLER, M; KEMPER, T; STERN, W; FORBES, W; HALL, R; BRONZINO, JD; KISSANE, J; HAWRYLEWICZ, E; RESNICK, O (1978). The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 2: 137-230.
 60. MORGANE, PJ; AUSTIN-LAFRANCE, RJ; BRONZINO, J; TONKISS, J; DIAZ-CINTRA, S; CINTRA, L; KEMPER, T; GALLER, JR; (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.
 61. NEDERGAARD M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263: 1768-1771.
 62. OKEN E e GILLMAN MW (2003) Fetal Origins of Obesity. *OBESITY RESEARCH* Vol. 11 No. 4.
 63. ONIS M; FRONGILLO EA; BLÖSSNER M (2000). Is malnutrition declining? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. *Bulletin of the World Health Organization*, 78: 1222-1233.
 64. PINTO-OLIVEIRA AV; GUEDES RCA. (2008) Direct evidence of inter-hemispheric modulation by callosal fibers: a cortical spreading depression study in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Exp Brain Res* 186:39–46
 65. PASCUAL-LEONE, A; TORMOS, JM; KEENAN, J; TARAZONA, F; CANETE, C & CATALA, MD (1998) Study and modulation of human cortical excitability with transcranial magnetic stimulation. *J Clin Neurophysiol*, 15, 333-343.
 66. PLAGEMANN A; RAKE A; HARDER T; MELCHIOR K; ROHDE W; DORNER G. (1998) Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Neuroscience Letters* 258 13–16.
 67. PLAGEMANN A; HARDER T; RAKE A; VOITS M; FINK H; ROHDE W; DÖRNER G (1999). Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of

- hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Research* 836:146–155.
68. RASMUSSEN KM (1998). Effects of Under- and Overnutrition on Lactation in Laboratory Rats. *Journal of nutrition*, 128: 390-393.
 69. ROCHA-DE-MELO AP (2001). Modificação do estado nutricional no rato recém-nascido, por manipulação do tamanho da ninhada: estudo morfo-funcional do sistema nervoso. Tese (Doutorado)- Departamento de Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco.
 70. ROCHA-DE-MELO, AP; GUEDES, RCA; (1997). Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 663–669.
 71. ROCHA-DE-MELO, AP; PICANÇO-DINIZ, CW; BORBA, JMC; SANTOS-MONTEIRO, J; GUEDES, RCA (2004). NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. *Nutr. Neurosci.* 7, 207–216.
 72. ROCHA-DE-MELO, AP; CAVALCANTI, JB; BARROS, AS; GUEDES, RCA (2006). Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9:155-160..
 73. SANTOS-MONTEIRO, J; TEODÓSIO, NR e GUEDES, RCA (2000) Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience* 3, 29–40.
 74. SANTOS-MONTEIRO J, GUEDES RCA, MANHÃES-DE-CASTRO R, CABRAL-FILHO JE. (2002) Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife*, 2 (1): 15-22, jan. – abril.
 75. SMART J, DOBBING J (1971) Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Research*, 28: 85-95.
 76. TAKANO, K; LATOUR, LL; FORMATO, JE; CARANO. RAD; HELMER, KG; HASEGAWA, Y; SOTAK, CH e FISHER, M (1996) The role of spreading

- depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Annals of Neurology* **39**, 308-318.
77. TEODÓSIO, NR; LAGO, ES; ROMANI, SAM; GUEDES, RCA (1990) A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoam. Nutr.*, 40 (4): 533-547.
 78. VELKOSKA E; COLE TL; MORRIS MJ (2005) Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am. J. Endocrinol Metab* 288: E1236-E1243.
 79. WANDERLEY L (2003). Influência do exercício físico sobre a lactação de ratos desnutridos pela Dieta Básica Regional. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.
 80. WILSON, CL; ISOKAWA, M; BABB, TL; CRANDALL, PH (1990) Functional connections in the human temporal lobe. I. Analysis of limbic system pathways using neuronal responses evoked by electrical stimulation. *Exp.Brain Res.*, 82, 279–292.
 81. XIMENES-DA-SILVA A e GUEDES RCA (1991). 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*, 24: 1277-1281.
 82. YOUNG JB (2002). Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats. *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol* 282: R1113-R1121.

ANEXOS

Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation

Felipe Fregni,¹ Katia K. Monte-Silva,² Manuella B. Oliveira,² Steven D. Freedman,¹ Alvaro Pascual-Leone¹ and Rubem C. A. Guedes²

¹Harvard Center for Non-invasive Brain Stimulation and Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA

²Laboratory of Neurophysiology and Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco State, Recife, Brazil

Keywords: depression, electrical stimulation, prefrontal cortex, transcranial magnetic stimulation, Wistar rats

Abstract

Clinical applications of brain stimulation have been increasing during the last decade; however, the mechanisms of action remain unknown. One proposed mechanism of action is that repetitive stimulation modulates cortical excitability. Herein, we explore the question of whether repetitive electric stimulation increases cortical excitability as indexed by the cortical spreading depression. Twenty-four Wistar rats were divided into three groups according to the treatment: sham, 1-Hz and 20-Hz stimulation. Stimulation was applied to the left frontal cortex through a pair of epidurally implanted silver-wire electrodes. The cortical spreading depression-features were analysed at three time points (one day before, one day after and 2 weeks after treatment) in both the stimulated and unstimulated hemisphere. A $3 \times 2 \times 3$ factorial ANOVA with repeated measures showed significant differences in the main effect of time ($P < 0.0001$), hemisphere ($P = 0.0002$) and stimulation group ($P = 0.008$). The interaction between time vs. hemisphere vs. stimulation group was also significant ($P < 0.0001$). *Posthoc* analysis demonstrated that 1-Hz and 20-Hz repetitive electrical stimulation significantly increased the velocity of cortical spreading depression in the stimulated hemisphere. Furthermore, 20-Hz stimulation showed a greater effect on cortical spreading depression compared to 1-Hz stimulation. The results show that 1-Hz and 20-Hz repetitive electrical stimulation results in an increase in cortical spreading depression velocity that is associated with the frequency and the hemisphere of stimulation. Furthermore, the effects are found to be long lasting. We believe that these findings have strong relevance to support the clinical application of therapies involving electrical stimulation for diseases of reduced cortical excitability.

Introduction

Various forms of brain stimulation appear to be effective in the treatment of neurological and psychiatric diseases (George *et al.*, 2002; Benabid, 2003; Kennedy *et al.*, 2003; Maertens de Noordhout, 2004). For instance, electroconvulsive therapy (ECT) has been used for years in the treatment of depression and still seems to be the most effective treatment of depression available (van der Wurff *et al.*, 2003). Recently, new forms of brain stimulation, such as transcranial magnetic stimulation (TMS) and transcranial stimulation with weak direct current, have shown promise in the treatment of depression, epilepsy, chronic pain, tinnitus, schizophrenia and stroke (Burt *et al.*, 2002; Nitsche *et al.*, 2003). Moreover, deep brain stimulation and vagal nerve stimulation are potentially promising treatments for Parkinson's disease, dystonia, depression and epilepsy (George *et al.*, 2002; Benabid, 2003).

Although the clinical effects of brain stimulation have been repeatedly demonstrated to be clinically effective, there is little information about its mechanisms of action. One suggested mechanism is the modulation of excitability in the targeted brain region with

resulting impact on connected brain areas along a specific neural network (Pascual-Leone *et al.*, 1998). However, supporting evidence for this is largely indirect as the tools to study brain function non-invasively in humans, such as functional magnetic resonance imaging and electroencephalogram, lack causality and spatial resolution. The study of the cortical spreading depression (CSD) phenomenon provides a method to experimentally explore such notions directly. In addition, CSD provides a reliable index of brain cortical excitability.

CSD was first described by Leao in 1944 (Leao, 1944). It is characterized by massive alterations in cerebrocortical ion homeostasis in response to the stimulation of a point of the brain tissue. These alterations result in a wave of neuronal depolarization that propagates, in the cerebral cortex of all mammal species that have been previously studied, at a rate of 2–5 mm/min across the cortical surface, accompanied by reversible electroencephalogram (EEG) suppression and a negative deflection of the direct current potential (Guedes & Cavalheiro, 1997). The study of CSD is important for several reasons. Firstly, it appears to be related to disorders of altered brain excitability such as migraine attack and epilepsy (Aurora *et al.*, 1999). Secondly, CSD has been extensively studied in several conditions of brain function alteration, providing important information about brain activity and, therefore being a useful index to study brain function

Correspondence: Dr Felipe Fregni, as above.

E-mail: ffregni@bidmc.harvard.edu

Received 15 December 2004, revised 3 February 2005, accepted 24 February 2005

experimentally (Guedes, 1984). However, given that cortical spreading depression propagates along the cortical surface, it provides information only about the cortical, but not subcortical, activity.

We hypothesized that repetitive cortical stimulation would alter CSD propagation. We had two aims in this study: (i) to investigate the effects of different frequencies of repetitive electrical stimulation on CSD propagation compared to sham stimulation and (ii) to evaluate whether the effects of electrical stimulation on CSD propagation are long-lasting.

Materials and methods

Animals

Twenty-four male adult Wistar rats (275 ± 7 g, mean $\pm$ SE) were used in this experiment. They were housed individually under controlled temperature and on a 12-h light : 12-h dark cycle (lights on at 06:00 h) with free access to rat chow pellets and tap water. Testing was carried out during the light cycle. All rats were cared for and used in strict accordance to the PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Importantly, all efforts were made to minimize the number of animals used. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Pernambuco State, Brazil, where the experiments were carried out.

Surgical procedure

Rats were anaesthetized with a mixture of urethane and chloralose (1.0 g/kg plus 0.04 g/kg i.p., respectively; one-third of the initial dose as supplement, if necessary) and placed in a stereotaxic frame in a flat-skull position. Urethane plus chloralose were used as these drugs do not block CSD propagation (Guedes *et al.*, 2002). During surgery and CSD recording, body temperature was continuously monitored with a rectal thermometer and was maintained at $37\text{--}37.5^\circ\text{C}$ by using a heating pad. A midline incision was made to expose the skull. Three holes (3–4-mm diameter) were drilled on each hemisphere with a 0.5-mm-diameter dental drill (Fig. 1). These holes were drilled very carefully while observing the tissue with an operating microscope to avoid causing injury to the dura. They were aligned in the parieto-frontal direction and parallel to the midline. A bipolar stimulating electrode (as described below) was implanted into the left frontal cortex and secured with dental acrylic. After the electrode implant, a baseline recording session of CSD was performed for 4 h. After that, burr holes were washed with saline and closed with vaseline gel, and

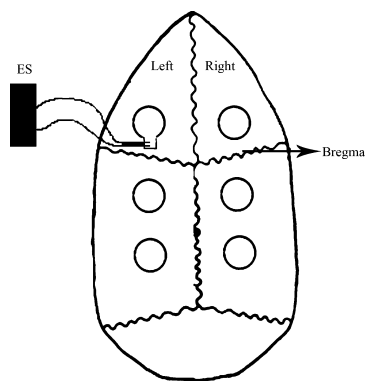


FIG. 1. Schematic illustration showing the location of the three holes in each hemisphere for CSD recording and the location of the electrical stimulating electrode (left prefrontal cortex).

the skin was flap-sutured over the cranium; however, the tips of the electrode were exposed in order to connect the cables from the stimulator to the stimulating electrode. Topical antibiotic was applied over the surgical incision and rats were placed in a cage and allowed to recover from surgery and to fully awaken for 24 h before the first session of repetitive electrical stimulation (ES).

Electrical stimulation (ES)

A bipolar stimulating electrode was made from Teflon-coated stainless steel wire (100- μm diameter), and the exposed tips were separated by 0.5 mm. This electrode was implanted epidurally into left frontal cortex (4.2 mm anterior to bregma and 3.5–4.0 mm lateral to the midline). We preferred epidural stimulation to decrease the risk of cortical lesion during the surgical procedure; this method has also been used in human brain stimulation (Brown *et al.*, 2003). Electrical stimulation was delivered by an electrical stimulator (Insight, Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brazil) and consisted of two different types of stimulation: (i) continuous stimulation of 1 Hz for 20 min (600 μA) with a total of 1200 pulses and (ii) 3-s trains of 20 Hz presented every 30 s for 10 min with a total of 1200 pulses. The animals were awake for the electrical stimulation as this stimulation was not painful.

Cortical spreading depression – basic mechanisms

Cortical spreading depression (CSD) is a self-propagating front of depolarization associated with a depression of neuronal activity for a couple of minutes. CSD can occur spontaneously, as proposed in migraine and epilepsy, or can be induced experimentally in animals. To induce CSD experimentally, the grey matter, e.g. cortex, should receive a strong stimulus, which can be chemical (KCl) or mechanical. This stimulus will generate a massive depolarization that is immediately followed by a depression of neuronal activity. In the rat cortex, this phenomenon spreads out in all directions at a velocity of 3.5 ± 0.5 mm/min. Therefore, to elicit and record this phenomenon, three holes needed to be drilled on the skull of the animal – one to trigger and the other two to record CSD. In our experiment, we used KCl to trigger CSD as this substance is effective in causing a massive depolarization. Recording was made with two Ag–AgCl agar-Ringer type electrodes. CSD has been studied *in vivo* in several animal species and *in vitro* in brain slices and in retinal preparations under various experimental conditions. The hypothesis underlying the mechanisms of CSD propagation is that the spread of CSD probably involves the release and diffusion of the chemical mediators, most likely K^+ and glutamate into the interstitial fluid. Therefore, levels of excitatory neurotransmitters, such as glutamate, can affect CSD initiation and propagation. Therefore CSD can be an index of the excitatory and inhibitory ions/neurotransmitters balance.

CSD recording

CSD induction was started after 30 min of baseline recording. The phenomenon was elicited at 20 min intervals by a 1-min application of a cotton ball (1–2-mm diameter), soaked in 2% KCl solution, to the posterior hole drilled in the parietal region. We investigated the CSD propagation in the posterior–frontal direction rather than the opposite direction as this montage is a more effective method of obtaining and recording the CSD propagation (Godukhin & Obrenovitch, 2001). The two other holes (3–4 mm in diameter) on the parieto-frontal region served as recording sites. The cortical spontaneous electrical activity

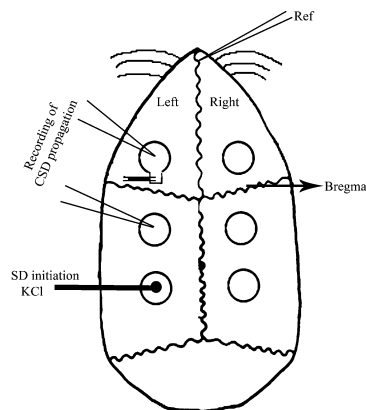


FIG. 2. Schematic illustration showing the location of epidural KCl application (occipital hole) and the location of the two electrodes (parietal and frontal) and the nasal reference for cortical spreading (CSD) recording.

(electrocorticogram) and the slow potential change accompanying CSD were continuously recorded for 4 h (2 h in each hemisphere) by using two Ag–AgCl agar-Ringer electrodes (one in each hole), against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bones (Fig. 2). The CSD velocity of propagation was calculated from the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical electrodes. Velocity was expressed as millimeters per minute (mm/min). During the recording period, rectal temperature was maintained at 37–37.5 °C. After the final episode of CSD, the burr holes were washed with saline solution.

Experimental design

The rats were randomized into three different groups according to the stimulation parameters: sham, 1-Hz and 20-Hz repetitive electrical stimulation. Initially, baseline CSD recording session was performed and stimulating electrode was implanted. Six episodes of CSD were recorded and their velocities of propagation were calculated in each hemisphere [left or stimulated hemisphere (SH) and right or unstimulated hemisphere (UH)]. Following the baseline measurement, animals were allowed to rest for 24 h. ES was then applied according to the following parameters: sham, 1 Hz or 20 Hz (600 μ A). We decided to use 600 μ A, because this parameter corresponded to an average of 120% of the forepaw motor threshold. The animals were stimulated two times per day (morning and evening) for 2 days, total of four sessions. During the stimulation, the animals were awake and could move freely in the cage; however, they were placed in a small cage in order to avoid brisk movements that could detach the connection cables from the stimulator to the electrodes (Fig. 3). Furthermore, the investigator observed the animals during the whole period of stimulation. In the day following the last stimulation, a second recording session of CSD was performed. The animals were returned to their cages and were maintained for 2 weeks without any intervention. After this period, the last recording session of CSD (follow-up recording) was made. Animals were killed by decapitation (under anaesthesia) after the last CSD recording.

Statistical analysis

The main outcome of this study was the CSD velocity change induced by repetitive electrical stimulation. Three factors were analysed: the group of stimulation (three levels – sham, 1 Hz and 20 Hz), time

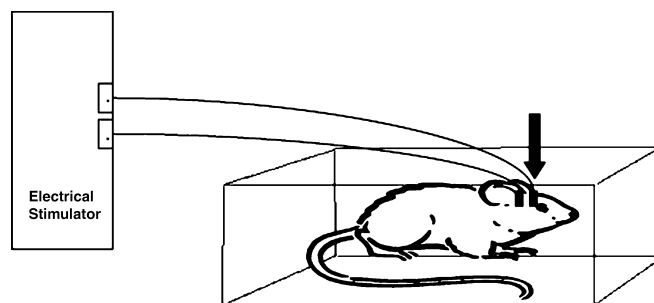


FIG. 3. Schematic illustration depicting the setting that was used for electrical stimulation. During the stimulation, the animals were awake and could move freely in the cage; however, they were placed in a small cage to avoid brisk movements that could detach the connection (cables from stimulator to tips of electrodes, black arrow).

(three levels – baseline, after stimulation sessions, and follow-up) and the brain hemisphere (two levels – stimulated and unstimulated). Analyses were performed with SAS statistical software (version 8.0, Cary, North Carolina, USA). Considering that we measured the CSD at three different timepoints (baseline, immediately after, and 15 days after stimulation) and on two hemispheres (stimulated and unstimulated hemispheres) in three different groups (sham, 1 Hz and 20 Hz stimulation), we used repeated measures (on the factor time) of analysis of variance (ANOVA) to test whether there was an overall significant effect of time, group, hemisphere or the interaction between these factors. When appropriate, *posthoc* comparisons were carried out using Fisher LSD correction for multiple comparisons. Statistical significance refers to a two-tailed *P*-value < 0.05.

Results

There were no significant differences in the baseline characteristics (weight, age, baseline CSD velocity of propagation) of the animals in the three groups of treatment. A three stimulation-group (sham vs. 1-Hz stimulation vs. 20-Hz stimulation) $\times$ 2 hemispheres (left vs. right) $\times$ 3 time (pre-stimulation vs. immediate post-stimulation vs. 15 days post-stimulation) factorial ANOVA with repeated measures on time was performed on CSD velocity values. There were significant differences found for the main effect of time ($F_{2,14} = 75.4$, $P < 0.0001$), hemisphere ($F_{1,7} = 50.8$, $P = 0.0002$) and stimulation group ($F_{2,14} = 6.7$, $P = 0.008$). The interaction between time vs. hemisphere vs. stimulation group was significant ($F_{4,28} = 9.35$, $P < 0.0001$).

Sham stimulation group

In order to test whether our procedure was associated with changes in the CSD velocity, we studied a control group that received the same intervention (including electrode implantation), but electric stimulation was not applied. We did not find any significant change in the CSD propagation in this treatment group over time. Repeated measures ANOVA showed that there was neither significant main effect of time on CSD propagation in the left hemisphere (SH) ($F_{2,14} = 2.3$, $P = 0.134$) nor in the right hemisphere (UH) ($F_{2,14} = 1.9$, $P = 0.190$). The mean results of CSD velocity for the three timepoints (baseline, immediately after and 15 days after ES) confirm these findings (3.84 ± 0.08 , 3.90 ± 0.15 , 3.91 ± 0.10 ; mean $\pm$ SD in mm/min for baseline, post-treatment and follow-up, respectively) (Fig. 4A).

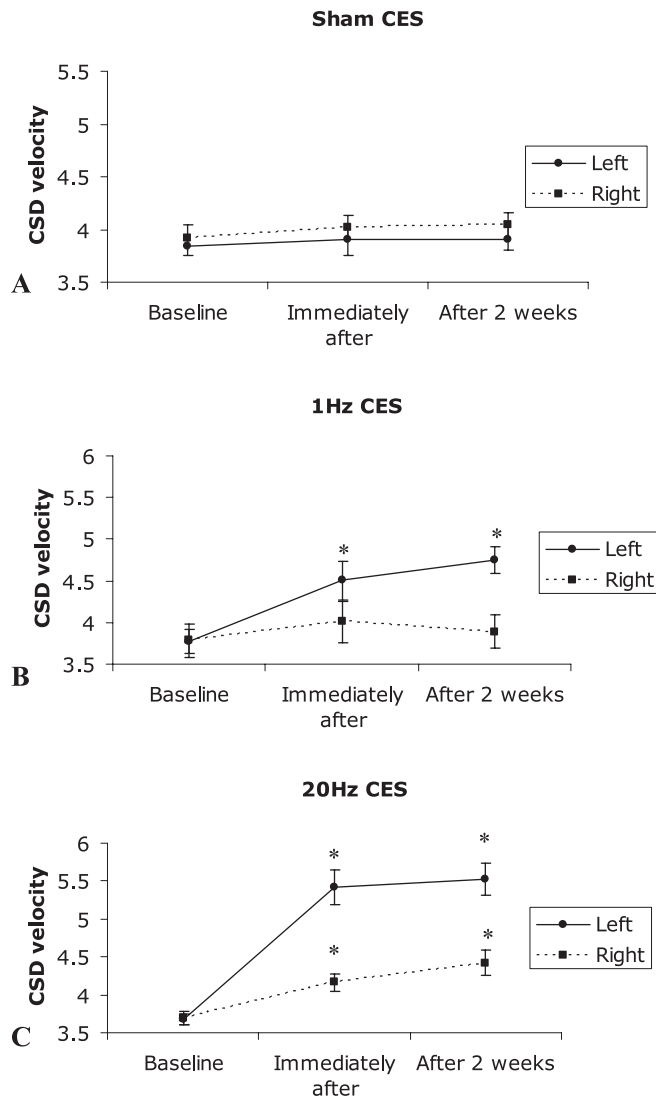


FIG. 4. The effects of electrical stimulation of the left prefrontal cortex on the CSD velocity over the three timepoints (baseline, immediately after stimulation and 2 weeks after stimulation) in the left (stimulated hemisphere) and right (unstimulated) hemisphere. (A) The effects of sham ES. Note that there were no significant effects of sham stimulation on CSD propagation over the three time points. (B) The effects of 1 Hz ES. Note that there was a significant increase in the CSD velocity after 1 Hz stimulation in the stimulated hemisphere (left hemisphere) when comparing baseline and immediately after stimulation and baseline and after 2 weeks. *Statistically significantly when compared to baseline. (C) The effects of 20 Hz ES. Note that both hemispheres (stimulated and unstimulated) had a significant increase in the CSD propagation immediately after and after 2 weeks of 20 Hz stimulation, however, the effects were significantly more pronounced in the stimulated hemisphere. Each point represents mean velocity of CSD $\pm$ SEM. *Statistically significantly when compared to baseline.

1-Hz stimulation group

Our results showed that there was an increase in CSD propagation following 1-Hz stimulation only in the stimulated hemisphere. Repeated measures ANOVA showed that there was a significant main effect of time on CSD velocity in the left hemisphere (SH) ($F_{2,14} = 19.6$, $P < 0.0001$) but not in the right hemisphere (UH) ($F_{2,14} = 2.1$, $P = 0.16$). *Posthoc* analysis showed a significant difference between baseline and post-stimulation CSD ($P = 0.0005$) and baseline and follow-up CSD ($P < 0.0001$), but not between post-stimulation and follow-up CSD ($P = 0.15$) for the left hemisphere

(SH). These results suggest that the initial effect on CSD was retained after 2 weeks of electrical stimulation. The mean increase in CSD velocity after 1-Hz stimulation was 19.6% (3.76 ± 0.41 ; 4.50 ± 0.67 ; 4.75 ± 0.46 ; mean $\pm$ SD in mm/min for baseline, post-treatment and follow-up, respectively) (Fig. 4B).

20-Hz stimulation group

Repeated measures ANOVA showed that there was a significant main effect of time on CSD propagation in the left hemisphere (SH) ($F_{2,14} = 44.7$, $P < 0.0001$) and in the right hemisphere (UH) ($F_{2,14} = 31.1$, $P < 0.0001$). *Posthoc* analysis showed a significant difference between baseline and post-stimulation CSD ($P < 0.001$ both hemispheres) and baseline and follow-up CSD ($P < 0.001$ both hemispheres), but not between post-stimulation and follow-up CSD ($P = 0.64$ and $P = 0.07$) for left hemisphere and right hemisphere, respectively. These results suggest that: (i) 20 Hz electrical stimulation caused a significant increase on CSD velocity on both hemispheres (stimulated and unstimulated) and (ii) the initial effect on CSD was retained after 2 weeks of electrical stimulation. The mean increase in CSD velocity after 20 Hz stimulation was higher in the stimulated hemisphere compared to the unstimulated hemisphere: 47.4% versus 13.8% of CSD velocity, respectively (Fig. 4C).

Comparison across study groups revealed that 20-Hz electrical stimulation led to a significantly greater increase in CSD velocity compared to the increase caused by 1-Hz electrical stimulation (47.4% vs. 19.6% , $P = 0.02$).

Discussion

These results show that both 1-Hz and 20-Hz electrical stimulation (ES) resulted in a significant increase in the CSD velocity in the stimulated hemisphere. Furthermore, 20-Hz cortical stimulation caused an increase in the CSD propagation also in the contralateral, unstimulated hemisphere. The effects of electrical stimulation on CSD propagation lasted for at least 2 weeks. Importantly, these effects cannot be attributed to the pre-ES (baseline) induced CSD, as animals that underwent sham stimulation did not show any change in the CSD propagation between the three time points.

Our study showed that the repetitive ES enhanced CSD propagation. Various mechanisms could explain these CSD changes. Repetitive ES may have altered brain excitability as indexed by changes in CSD. CSD does provide a measure of cortical excitability. For example, GABAergic inhibitors, such as ethanol, can cause a decrease in CSD propagation rate – attributed to the inhibitory effects of ethanol on brain tissue (Sonn & Mayevsky, 2001). Therefore, the findings of our study show that ES might have increased cortical excitability.

More evidence that strengthens the association of CSD to brain excitability involves the relationship between migraine and CSD (Tepper *et al.*, 2001). Four main arguments support this remark: (i) it has been postulated that CSD underlies the pathophysiology of migraine aura as both phenomenon have similar velocity of propagation according to neuroimaging, clinical and animal studies (Spierings, 2003; Lauritzen, 1987; Parsons, 2004); (ii) magnetoencephalogram and TMS studies have shown that migraine is associated with an increase in brain excitability (Lang *et al.*, 2004; Brighina *et al.*, 2002), indeed the migraine attack may represent a protective mechanism triggered by brain cells to avoid injury due to hyper-excitability of the brain; (iii) migraine patients seem to respond to anticonvulsive medications showing that this disease is related to an

increase in brain excitability (Rogawski & Loscher, 2004); (iv) some of the migraine triggers, such as stress and hypoglycemia, are also associated with an increase in CSD propagation (Costa-Cruz & Guedes, 2001). For the reasons exposed, we believe that an increase in the CSD propagation is associated with an increase in brain excitability; therefore, we speculate that ES can cause an increase in brain excitability similar to the increase in brain excitability that is observed in migraine.

Another possible mechanism to explain the effects of repetitive ES on CSD would be an alteration of the glial gene expression. Glial cells are non-neuronal cells that provide support and nutrition to cells of the nervous system. Unlike neurons, glial cells do not have chemical synapses, they, however, can promote the interaction between neurons and appear to contribute to synaptic development. On one hand, it has been proposed that glia may actively interfere with CSD; Leibowitz (1992) suggested that the most essential constituent of CSD is a slowly propagating, regenerative event in the neuroglia compartment. Indeed, the dramatic CSD-related changes in the ionic concentrations in the extra cellular space supports this view (Lian & Stringer, 2004). On another hand, past research suggests that electrical stimulation might induce changes in the neuroglia. In fact, it has been shown that reactive changes in glia are related to the synaptic reorganization that occurs in response to certain patterns of neuronal activity (Wilson *et al.*, 1990). As neuronal activity can be changed by electrical stimulation, this can ultimately alter glia. For instance, it has been demonstrated that the gene of the glial fibrillary acidic protein (GFAP), whose expression is a hallmark of glial hypertrophy (Lewis *et al.*, 1984; Tetzlaff *et al.*, 1988) and is associated with an increase in neurotransmitters levels, is up-regulated after convulsive electric shock in animals (Steward *et al.*, 1991). However, in this case, it is difficult to disentangle the effects of electrical stimulation from the effects of seizures. Nonetheless, another form of brain stimulation, transcranial magnetic stimulation, can also increase GFAP gene expression (Fujiki & Steward, 1997). In this study, authors did not observe seizures and thus conclude that the increase of GFAP gene expression is associated with electrical brain stimulation.

Given that repetitive electrical stimulation can cause seizures, it is conceivable to speculate that seizures might have been one of the causes for the CSD propagation increase. However, two arguments go against this association in this study. (i) There was no change in animal behaviour during or shortly after the stimulation and (ii) the parameters that we used for stimulation are not associated with seizure-induction. Behavioural responses to ES-induced seizures include increased locomotion, circling and convulsions (beginning with head, one or two forepaws contraction and progressing to a generalized tonic-clonic convulsion) (Nakamura-Palacios *et al.*, 1999). We did not observe any of these alterations during or shortly after ES stimulation. The protocol to induce seizure uses higher frequency and longer train durations compared to our study, e.g. frequency of 60 Hz vs. 20 Hz (used in our study) and trains of 30 s vs. 2 s (used in our study) (Nakamura-Palacios *et al.*, 1999). Furthermore, a long inter-interval train, such as the one that was used in this study (28 s), also prevents seizures (Wassermann, 1998). However, although this appears unlikely, due to the evidence shown above, the occurrence of seizures could have increased cortical excitability and been responsible for the increase in the CSD propagation. In fact, it has been suggested that ECT might increase neuronal excitability due to a suppression of GABA-ergic inhibition (Chistyakov *et al.*, 2005).

Given that ES effects on CSD might be due to an increase in cortical excitability, it is important to discuss the mechanisms underlying this increase in the cortical excitability. One possible explanation is that ES could have changed synaptic strength. It has been shown that low-

frequency repetitive electrical stimulation can induce either a long-term potentiation (LTP) or a depression (LTD) of the synaptic transmission. For instance, low-frequency electrical stimulation (2 Hz) is associated with an immediate depression and late significant potentiation of the synaptic transmission (Herry *et al.*, 1999). Furthermore, high frequency electrical stimulation (250 Hz) also potentiates synaptic transmission immediately and afterward (Herry & Garcia, 2002). Chen *et al.* (1996) reported similar results showing that while high frequency stimulation (100 or 40 Hz) in cortical layer IV induces LTP, low frequency stimulation (1 Hz, 15 min) induces LTD. Also this response was reduced by DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid, implying that *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are involved in LTD/LTP induction. However, this study only evaluated the immediate effects, thus could not detect a possible LTP at a later time. Therefore an increase in the synaptic transmission, or the LTP mechanism, induced by ES can explain an increase in the CSD propagation. Furthermore, these studies showed that, after one week of stimulation, synaptic changes were still occurring. This would explain the long-lasting effects in our study – there was a persistence of CSD increase throughout the follow-up period.

However, ES effects on CSD might also be due to non-specific effects of ES, such as, neuroendocrine, metabolic or behavioural changes. Several studies have shown that electrical stimulation of prefrontal cortex is associated with neuroendocrine changes, such as, an increase in cholecystotokinin release in the nucleus accumbens septi following 25 Hz ES (You *et al.*, 1998); a decrease in dopamine release in nucleus accumbens after 10 Hz ES and an increase, after 60 Hz ES (Jackson *et al.*, 2001); and an enhancement of serotonin levels in the hippocampus and amygdala after 25 Hz TMS (Juckel *et al.*, 1999). Furthermore, frontal ES can also induce behavioural changes. Tavares *et al.* (2004) reported that unanaesthetized animals submitted to electrical stimulation present behavioural changes characterized as increased locomotion and cage exploration (Tavares *et al.*, 2004). However, another study showed that behavioural changes following frontal ES in these animals do not reflect an alteration of the spatial learning and short- or long-term memory. Finally, other non-specific effects after ES stimulation, such as cardiovascular, are possible. Tavares *et al.* (2004) showed that ES of the prefrontal cortex causes stimulus intensity-related depressor responses in anaesthetized rats and pressor responses in unanaesthetized rats. In addition, this study reported no significant heart rate changes. Therefore, non-specific changes after prefrontal cortex electrical stimulation is possible and should be considered when assessing the effects of this study. However, it is not clear how such changes would interfere with the phenomenon of spreading depression.

Our findings show that the effect of ES on CSD propagation depends on the frequency of the stimulation. We showed that the frequency of stimulation was related to the degree of impact on CSD velocity (e.g. higher frequency resulted in faster CSD propagation) and bihemispheric disruption (e.g. higher frequency resulted in an effect on both hemispheres). These findings are partially in line with another form of brain stimulation – repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). The effect of rTMS also depends on the frequency of stimulation. However, in the case of the TMS, the direction of the modulation seems different, whereas high frequency (20 Hz) causes an increase in brain excitability, low frequency (1 Hz) causes a decrease in brain excitability (Gangitano *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2002). Our findings, however, suggest that 1 Hz and 20 Hz ES behave in the same way, i.e. increasing brain excitability. The cause of such discrepancy is unclear, but it can be speculated that this may be related to the different subtype of neurons that are stimulated by each

technique (ES and TMS). Nonetheless, recently, Siebner *et al.* (2004) demonstrated that pre-conditioning corticospinal excitability with transcranial direct current stimulation over the primary motor cortex can modulate the direction of plasticity induced by subsequent administration of 1 Hz rTMS in a way that 1 Hz rTMS results in an increase of cortical excitability (Siebner *et al.*, 2004). Furthermore, low-frequency prefrontal ES is associated with a LTP phenomenon after 1 week of stimulation (Herry *et al.*, 1999). Therefore, such findings support that low frequency repetitive ES can also have facilitatory effects.

An important aspect of this study is the long-lasting effect of ES on CSD. The effects lasted at least 15 days and may have lasted more if animals had been followed for longer time. This long-lasting effects of repetitive ES may provide a biological mechanism to explain long-lasting behavioural and clinical effects of brain stimulation in major depression (Fregni *et al.*, 2004; Dannon *et al.*, 2002). However, these results also raise potential safety concerns when applying brain stimulation to normal subjects and warrants further investigation. It is important to note that our animals received multiple sessions of stimulation to the same brain region; the impact of a single session is unclear. However, long-lasting effect is critical for the use of this method as a therapeutic tool. Therefore, this gives additional evidence that brain stimulation might be a useful therapeutic tool.

Some limitations apply to the present study. As we did not examine the brain tissue histologically, it is possible that harmful effects may have contributed to our results. The design of this study cannot exclude this potential bias. However, some evidences speak against this effect. First, several studies in which animals received electrical stimulation in the prefrontal cortex, using similar, or even stronger parameters as in our study, do not report histological lesion (Penna *et al.*, 1998; You *et al.*, 1998; Juckel *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2001; Tavares *et al.*, 2004). For example, in one of these experiments, animals were stimulated with 400 Hz for 40 min using an intensity of 700 μ A (30 times more pulses than our study; You *et al.*, 1998). Second, studies that evaluated CSD propagation in animals before and after cortical and subcortical lesions due to stroke showed no change, or even a decrease, in CSD propagation (Shimizu *et al.*, 2000; Back *et al.*, 1996). However, we demonstrated that CSD propagation increased after repetitive electrical stimulation. Finally, there is a trend of increase in the CSD velocity between immediately after and follow-up evaluation. If our protocol had induced a cortical lesion, we would expect that the peak of effects in the CSD would occur immediately rather than two weeks after stimulation. Indeed, a recent repetitive TMS study showed that the modulatory effects in the cortical stimulated area by this method continued after the cessation of repetitive TMS (Koerselman *et al.*, 2004). Another limitation is that, although the method of CSD is a good method to study brain function, this method provides information only about the cortical surface as CSD spreads along the cortical surface. Therefore, the results have to be interpreted in the context of cortical brain alterations. Finally, although it is conceivable that the different effects observed between the 1 Hz and 20 Hz could be due to session duration (whereas 1 Hz stimulation lasted 20 min, 20 Hz lasted 10 min only), we believe that this explanation is unlikely as the most important factors for cortical modulation induced by repetitive stimulation seem to be the frequency and number of pulses (Maeda *et al.*, 2000; Gangitano *et al.*, 2002; Gershon *et al.*, 2003; Peinemann *et al.*, 2004).

In summary, our study showed that repetitive electrical stimulation can facilitate CSD propagation and these effects are long lasting. These findings are important to support the clinical application of therapies involving electrical stimulation such as transcranial magnetic stimulation, transcranial direct current stimulation and invasive

cortical stimulation for diseases of reduced cortical excitability, such as stroke, Parkinson's disease and major depression.

Acknowledgements

This work was supported by a grant within the Harvard Medical School Scholars in Clinical Sciences Program (NIH K30 HL004095-03) to F.F. and K24 RR018875 (NIH-NCRR) to A.P.-L. R.C.A.G. is research fellow of the Brazilian Agency CNPq (#52.0722/96).

Abbreviations

CSD, cortical spreading depression; ES, electrical stimulation; ECT, electroconvulsive therapy; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; rTMS, repetitive transcranial magnetic stimulation; SH, stimulated hemisphere; TMS, transcranial magnetic stimulation; UH, unstimulated hemisphere.

References

- Aurora, S.K., Cao, Y., Bowyer, S.M. & Welch, K.M. (1999) The occipital cortex is hyperexcitable in migraine: experimental evidence. *Headache*, **39**, 469–476.
- Back, T., Ginsberg, M.D., Dietrich, W.D. & Watson, B.D. (1996) Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 202–213.
- Benabid, A.L. (2003) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 696–706.
- Brighina, F., Piazza, A., Daniele, O. & Fierro, B. (2002) Modulation of visual cortical excitability in migraine with aura: effects of 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation. *Exp. Brain Res.*, **145**, 177–181.
- Brown, J.A., Lutsep, H., Cramer, S.C. & Weinand, M. (2003) Motor cortex stimulation for enhancement of recovery after stroke: case report. *Neurol. Res.*, **25**, 815–818.
- Burt, T., Lisanby, S.H. & Sackeim, H.A. (2002) Neuropsychiatric applications of transcranial magnetic stimulation: a meta analysis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **5**, 73–103.
- Chen, W.R., Lee, S., Kato, K., Spencer, D.D., Shepherd, G.M. & Williamson, A. (1996) Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8011–8015.
- Chistyakov, A.V., Kaplan, B., Rubichek, O., Kreinin, I., Koren, D., Hafner, H., Feinsod, M. & Klein, E. (2005) Effect of electroconvulsive therapy on cortical excitability in patients with major depression: a transcranial magnetic stimulation study. *Clin. Neurophysiol.*, **116**, 386–392.
- Costa-Cruz, R.R. & Guedes, R.C. (2001) Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neurosci. Lett.*, **303**, 177–180.
- Dannon, P.N., Dolberg, O.T., Schreiber, S. & Grunhaus, L. (2002) Three and six-month outcome following courses of either ECT or rTMS in a population of severely depressed individuals – preliminary report. *Biol. Psychiatry*, **51**, 687–690.
- Fregni, F., Santos, C.M., Myczkowski, M.L., Rigolino, R., Gallucci-Neto, J., Barbosa, E.R., Valente, K.D., Pascual-Leone, A. & Marcolin, M.A. (2004) Repetitive transcranial magnetic stimulation is as effective as fluoxetine in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **75**, 1171–1174.
- Fujiki, M. & Steward, O. (1997) High frequency transcranial magnetic stimulation mimics the effects of ECS in upregulating astroglial gene expression in the murine CNS. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **44**, 301–308.
- Gangitano, M., Valero-Cabre, A., Tormos, J.M., Mottaghy, F.M., Romero, J.R. & Pascual-Leone, A. (2002) Modulation of input-output curves by low and high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. *Clin. Neurophysiol.*, **113**, 1249–1257.
- George, M.S., Nahas, Z., Bohning, D.E., Kozel, F.A., Anderson, B., Chae, J.H., Lomarev, M., Denslow, S., Li, X. & Mu, C. (2002) Vagus nerve stimulation therapy: a research update. *Neurology*, **59**, S56–S61.
- Gershon, A.A., Dannon, P.N. & Grunhaus, L. (2003) Transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression. *Am. J. Psychiatry*, **160**, 835–845.
- Godukhin, O.V. & Obrenovitch, T.P. (2001) Asymmetric propagation of spreading depression along the anteroposterior axis of the cerebral cortex in mice. *J. Neurophysiol.*, **86**, 2109–2111.
- Guedes, R.C. (1984) On some conditions that influence cortical spreading depression. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **56**, 445–455.

- Guedes, R.C., Amancio-Dos-Santos, A., Manhaes-De-Castro, R. & Costa-Cruz, R.R. (2002) Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr. Neurosci.*, **5**, 115–123.
- Guedes, R.C. & Cavalheiro, E.A. (1997) Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Res.*, **27**, 33–40.
- Herry, C. & Garcia, R. (2002) Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *J. Neurosci.*, **22**, 577–583.
- Herry, C., Vouimba, R.M. & Garcia, R. (1999) Plasticity in the mediodorsal thalamo-prefrontal cortical transmission in behaving mice. *J. Neurophysiol.*, **82**, 2827–2832.
- Jackson, M.E., Frost, A.S. & Moghaddam, B. (2001) Stimulation of prefrontal cortex at physiologically relevant frequencies inhibits dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, **78**, 920–923.
- Juckel, G., Mendlin, A. & Jacobs, B.L. (1999) Electrical stimulation of rat medial prefrontal cortex enhances forebrain serotonin output: implications for electroconvulsive therapy and transcranial magnetic stimulation in depression. *Neuropsychopharmacology*, **21**, 391–398.
- Kennedy, R., Mittal, D. & O'Jile, J. (2003) Electroconvulsive therapy in movement disorders: an update. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **15**, 407–421.
- Koerselman, F., Laman, D.M., van Duijn, H., van Duijn, M.A. & Willems, M.A. (2004) A 3-month, follow-up, randomized, placebo-controlled study of repetitive transcranial magnetic stimulation in depression. *J. Clin. Psychiatry*, **65**, 1323–1328.
- Lang, E., Kaltenhauser, M., Neundorfer, B. & Seidler, S. (2004) Hyperexcitability of the primary somatosensory cortex in migraine – a magnetoencephalographic study. *Brain*, **127**, 2459–2469.
- Lauritzen, M. (1987) Cerebral blood flow in migraine and cortical spreading depression. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, **113**, 1–40.
- Leao, A.A.P. (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, **7**, 359–390.
- Leibowitz, D.H. (1992) The glial spike theory. I. On an active role of neuroglia in spreading depression and migraine. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **250**, 287–295.
- Lewis, S.A., Balcarek, J.M., Krek, V., Shelanski, M. & Cowan, N.J. (1984) Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 2743–2746.
- Lian, X.Y. & Stringer, J.L. (2004) Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain Res.*, **1012**, 177–184.
- Maeda, F., Keenan, J.P., Tormos, J.M., Topka, H. & Pascual-Leone, A. (2000) Modulation of corticospinal excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin. Neurophysiol.*, **111**, 800–805.
- Maertens de Noordhout, A. (2004) Clinical applications of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Rev. Med. Liege*, **59**, 170–175.
- Nakamura-Palacios, E.M., de Oliveira, R.W. & Gomes, C.F. (1999) Effects of diazepam or haloperidol on convulsion and behavioral responses induced by bilateral electrical stimulation in the medial prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **23**, 1369–1388.
- Nitsche, M.A., Liebetanz, D., Antal, A., Lang, N., Tergau, F. & Paulus, W. (2003) Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation – technical, safety and functional aspects. *Suppl. Clin. Neurophysiol.*, **56**, 255–276.
- Parsons, A.A. (2004) Cortical spreading depression: its role in migraine pathogenesis and possible therapeutic intervention strategies. *Curr. Pain Headache Rep.*, **8**, 410–416.
- Pascual-Leone, A., Tormos, J.M., Keenan, J., Tarazona, F., Canete, C. & Catala, M.D. (1998) Study and modulation of human cortical excitability with transcranial magnetic stimulation. *J. Clin. Neurophysiol.*, **15**, 333–343.
- Peinemann, A., Reimer, B., Loer, C., Quartarone, A., Munchau, A., Conrad, B. & Siebner, H.R. (2004) Long-lasting increase in corticospinal excitability after 1800 pulses of subthreshold 5 Hz repetitive TMS to the primary motor cortex. *Clin. Neurophysiol.*, **115**, 1519–1526.
- Penna, A.M., Lee, S.Y., Scheidegger da Silva, L., Oliveira, R.W., de Freitas Gomes, C. & Nakamura Palacios, E.M. (1998) Behavioral and cognitive effects produced by electrical stimulation in the medial prefrontal cortex: an experimental model for high cortical activation. *Neuropsychobiology*, **38**, 241–250.
- Rogawski, M.A. & Loscher, W. (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nature Med.*, **10**, 685–692.
- Romero, J.R., Anshel, D., Sparing, R., Gangitano, M. & Pascual-Leone, A. (2002) Subthreshold low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation selectively decreases facilitation in the motor cortex. *Clin. Neurophysiol.*, **113**, 101–107.
- Shimizu, K., Veltkamp, R. & Busija, D.W. (2000) Characteristics of induced spreading depression after transient focal ischemia in the rat. *Brain Res.*, **861**, 316–324.
- Siebner, H.R., Lang, N., Rizzo, V., Nitsche, M.A., Paulus, W., Lemon, R.N. & Rothwell, J.C. (2004) Preconditioning of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation with transcranial direct current stimulation: evidence for homeostatic plasticity in the human motor cortex. *J. Neurosci.*, **24**, 3379–3385.
- Sonn, J. & Mayevsky, A. (2001) The effect of ethanol on metabolic, hemodynamic and electrical responses to cortical spreading depression. *Brain Res.*, **908**, 174–186.
- Spierings, E.L. (2003) Pathogenesis of the migraine attack. *Clin. J. Pain*, **19**, 255–262.
- Steward, O., Torre, E.R., Tomasulo, R. & Lothman, E. (1991) Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 6819–6823.
- Tavares, R.F., Antunes-Rodrigues, J. & de Aguiar Correa, F.M. (2004) Pressor effects of electrical stimulation of medial prefrontal cortex in unanesthetized rats. *J. Neurosci. Res.*, **77**, 613–620.
- Tepper, S.J., Rapoport, A. & Sheftell, F. (2001) The pathophysiology of migraine. *Neurologist*, **7**, 279–286.
- Tetzlaff, W., Graeber, M.B., Bisby, M.A. & Kreutzberg, G.W. (1988) Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia*, **1**, 90–95.
- Wassermann, E.M. (1998) Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, June 5–7, 1996. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **108**, 1–16.
- Wilson, C.L., Isokawa, M., Babb, T.L. & Crandall, P.H. (1990) Functional connections in the human temporal lobe. I. Analysis of limbic system pathways using neuronal responses evoked by electrical stimulation. *Exp. Brain Res.*, **82**, 279–292.
- van der Wurff, F.B., Stek, M.L., Hoogendijk, W.J. & Beekman, A.T. (2003) The efficacy and safety of ECT in depressed older adults: a literature review. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **18**, 894–904.
- You, Z.B., Tzschentke, T.M., Brodin, E. & Wise, R.A. (1998) Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases cholecystokinin, glutamate, and dopamine release in the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study in freely moving rats. *J. Neurosci.*, **18**, 6492–6500.

After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression

David Liebetanz^{a,*}, Felipe Fregni^b, Katia K. Monte-Silva^c, Manuella B. Oliveira^c,
Ângela Amâncio-dos-Santos^c, Michael A. Nitsche^a, Rubem C.A. Guedes^c

^a Department of Clinical Neurophysiology, Georg-August-University, Robert-Koch Strasse 40, 37099 Göttingen, Germany

^b Harvard Center for Noninvasive Brain Stimulation, Harvard Medical School and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA

^c Laboratory of Neurophysiology and Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco State, Recife, Brazil

Received 23 November 2005; received in revised form 21 December 2005; accepted 21 December 2005

Abstract

Abnormal cortical excitability influences susceptibility to cortical spreading depression (CSD) in migraine. Because transcranial direct current stimulation (tDCS) is capable of inducing lasting changes of cortical excitability, we investigated the after-effects of tDCS on the propagation velocity of CSD in the rat. Twenty-five anesthetised rats received either anodal, cathodal or sham tDCS. The stimulation was applied for 20 min at a current strength of 200 μ A after the recording of three baseline CSD measurements. Starting 5 min after tDCS, a further three CSDs were elicited and CSD velocity recorded at intervals of 20 min. tDCS and CSD recording was performed under anaesthesia with chloralose and urethane. As compared to the baseline velocity of 3.14 mm/min, anodal tDCS induced a significant increase of propagation velocity during the first post-tDCS recording (3.49 mm/min). In contrast to anodal tDCS, neither cathodal tDCS nor sham tDCS, which consisted of an initial ramped DC stimulation lasting only 20 s, showed a significant effect on CSD propagation velocity. As anodal tDCS is known to induce a lasting increase of cortical excitability in the clinical setting, our results support the notion that CSD propagation velocity reflects cortical excitability. Since cortical excitability and susceptibility to CSD is elevated in migraine patients, anodal tDCS – by increasing cortical excitability – might increase the probability of migraine attack in these patients, even beyond the end of its application.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Transcranial direct current stimulation (tDCS); Spreading depression; Neuroplasticity; Migraine; Brain stimulation; Cortical excitability

The ability of weak direct current stimulation to induce long-lasting alterations of cortical excitability is already known from early animal experiments [4,18]. Recently, the DC-induced excitability changes have been successfully transferred to the human motor cortex, with after-effects so far lasting more than one hour [14–16]. Both the polarity-dependent induction of lasting excitability alterations as well as their stimulation duration- and current strength-dependent prolongation in the human cortex led to the reasonable assumption that this technique could evolve further into a promising therapeutic tool in various neurological and psychiatric disorders associated with a hypo- or hyperexcitable cortex, such as major depression, epilepsy or migraine. Functionally, transcranial direct current stimulation (tDCS) is able to improve implicit motor learning [17] and visuo-

motor coordination [2]. Clinically relevant studies demonstrated beneficial effects of cathodal tDCS in chronic stroke [9] and depression [6].

CSD was first described by Leão in the 1940s [11]. It is characterized by massive alterations in cerebrocortical ion homeostasis in response to the stimulation of a point in the brain tissue. These alterations result in a wave of neuronal excitation that propagate through the cortex at a rate of about 2–5 mm/min. The neuronal excitation is followed by a transient inhibition, which is reflected as EEG suppression and accompanied by a negative deflection of the direct current potential [23].

Neuroimaging findings indicate that cortical spreading depression represents the underlying mechanism of migraine aura [10]. The hypothesis that abnormal cortical activity leads to a susceptibility to CSD in migraineurs is supported by TMS studies revealing a cortical hyperexcitability in migraine patients [3]. Recent evidence of this causal link derives from CSD experiments, which demonstrated that a pathological cortical

* Corresponding author. Tel.: +49 551 39 6650; fax: +49 551 39 8126.
E-mail address: dliebet@gwdg.de (D. Liebetanz).

hyperexcitability in the knock-in mice of familial hemiplegic migraine leads to an increased susceptibility to CSD [25]. In addition to the association to migraine aura, CSD has been extensively studied in several conditions of brain function alteration, providing important information about brain activity, and has evolved as a useful index of cortical excitability [7].

We hypothesized that the induction of lasting changes of cortical excitability by tDCS would alter CSD propagation in a polarity specific way. The aim of this study was to investigate the effects of cathodal and anodal tDCS on CSD propagation compared to sham stimulation.

All experiments were conducted in accordance to the PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Pernambuco State, Brazil, where the experiments were carried out. The experiments were performed on 29 male Wistar rats (377 ± 45 g). Animals were housed under standard laboratory conditions, with food and water ad libitum.

The animals were randomized into three different groups, each of which received 20 min of cathodal, anodal or sham tDCS. Three episodes of CSD, with an interval of 20 min, were recorded from two cortical points prior as well as after the tDCS. The first post-tDCS CSD was elicited 5 min after the termination of tDCS. To test for the focality of the tDCS effects, a control experiment was performed on additional four animals, where CSD was recorded at three cortical points (instead of two) and tDCS treatment was applied, as it had turned out to be effective in the previous experiment.

The animals were anaesthetised with a mixture of urethane (1 g/kg) and chloralose (0.04 g/kg) and positioned in a stereotaxic apparatus. Body temperature was maintained at $37\text{--}37.5^\circ\text{C}$. Two holes of 2 mm in diameter were drilled over the right hemisphere, one hole 1 mm posterior to the coronal suture and the other 1 mm anterior to the lambdoid suture (Fig. 1a). To record CSD, two Ag-AgCl-Agar-Ringer electrodes (one in each hole) were gently placed onto the pia mater within a defined distance of each other. A common reference electrode of the same type was mounted on the nasal bone. For the control experiment, a third electrode was placed in an additional hole, which was drilled 4 mm anterior to the frontal electrode.

Cathodal and anodal tDCS was applied at a current strength of $200\text{ }\mu\text{A}$ by a constant current stimulator (model CX 6650, Schneider Electronics, Gleichen, Germany). For the transcranial stimulation a plastic jacket was positioned over the right parietal cortex just between the two boreholes and fixed with a coating of a glass ionomer cement (Ketac Cem, ESPE Dental AG, Seefeld, Germany). The jacket was filled with saline solution (0.9% NaCl) prior to the DC stimulation to establish a defined contact area (7 mm^2) towards the skull. A larger-sized conventional rubber plate electrode (10.5 cm^2) that was placed onto the ventral thorax served as counter electrode. To avoid a stimulation break effect, the current intensity was ramped for 10 s instead of switching on and off abruptly. In the sham condition the stimulation was ramped down again after 10 s of stimulation.

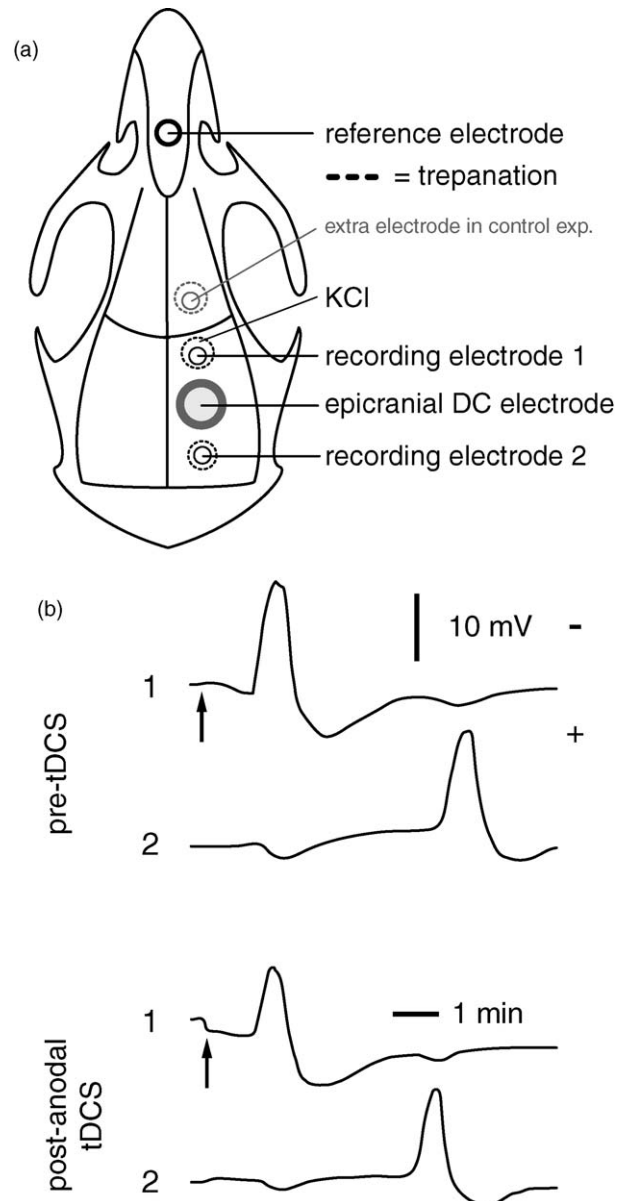


Fig. 1. (a) Graphical illustration of the positions of the epidural recording electrodes and the epicranial tDCS electrode. (b) Examples of CSDs recorded from a frontal (1) and from a caudal electrode (2). CSD was elicited with 2% KCl applied to the frontal cortex at the time-point indicated by the arrow. In the upper double trace, CSD is recorded prior to the tDCS intervention. The lower double trace illustrates the acceleration of CSD velocity 5 min after anodal tDCS.

CSD was elicited by applying a cotton ball (1–2 mm diameter) soaked in a 2% KCl solution to the frontal borehole just anterior to the recording electrodes for 1 min. CSD propagation was investigated in the fronto-posterior direction. The spontaneous cortical electrical activity (electrocorticogram) and the slow (DC) potential change accompanying CSD were recorded using a conventional Grass polygraph. The CSD propagation velocity (expressed as mm/min) was calculated from the time required for a CSD wave to pass the distance between two epicortical recording electrodes with the tDCS electrode in between (Fig. 1b). After elicitation of an initial CSD for testing the setup and the electrode contacts in each animal, we measured the

baseline CSD velocity, which was calculated as the mean of three CSDs that were recorded with an interval of 20 min prior to the tDCS. A further three CSDs were recorded after the tDCS.

In the control experiment, CSD velocity was also calculated for the passage over the cortex anterior to the tDCS electrode, i.e. between the additional rostral electrode and electrode 1.

At the end of the experiment, the animals were perfused transcardially with 100 ml of saline followed by 500 ml fixative containing 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). A freezing microtome was used to collect serial coronal 40- μ m thick sections throughout the brains. Sections were stained with cresyl violet and examined under a light microscope to evaluate tDCS-related alterations of the cortex such as oedema and necrosis or karyopyknosis, karyolysis and karyohexis at the cellular level.

Repeated measures analysis of variance (ANOVA) were performed with tDCS condition and time course as the independent variables and CSD velocity (in mm/min) serving as dependent variable to test whether there was an overall significant effect of time and stimulation condition, or an interaction between these factors. The values of the CSD velocity were normalised and expressed as alterations of CSD velocity as compared to baseline CSD velocity in mm/min. Baseline CSD velocity was calculated as the mean CSD velocity from the three pre-tDCS CSD recordings. A similar ANOVA was performed for the control experiment with recording site and time course as the independent variables and CSD velocity serving as dependent variable.

Post hoc comparisons were carried out using Scheffé's correction for multiple comparisons to compare the CSD velocity values of each tDCS condition with the respective baseline value (paired-sample, two-tailed). When appropriate, further calculations were performed to compare the CSD velocity with the corresponding time bin of the sham condition and of the tDCS condition with the opposite polarity including non-standardised baseline values. Similar post hoc tests were performed for the control experiment to compare the tDCS effects at both recording sites. Statistical significance refers to a p -value < 0.05 .

The baseline characteristics (weight, age) of the animals were not different in the three groups of treatment.

ANOVA with repeated measures on time was performed on CSD velocity values. There were significant differences for the main effect of time ($F = 16.99$, d.f. = 3, $p < 0.001$), stimulation condition ($F = 5.08$, d.f. = 2, $p = 0.008$) and the interaction effect between time and stimulation condition ($F = 11.48$, d.f. = 6, $p < 0.001$). Post hoc analysis showed no significant difference between the baseline CSD velocities of the three animal groups. In addition, there was no change of CSD velocity after sham tDCS at any time point of the post-stimulation CSD recordings when compared to the baseline CSD velocity. Post hoc analysis revealed a significant change of CSD propagation velocity during the first post-anodal-tDCS CSD recording when compared to baseline ($p < 0.0001$), sham stimulation ($p = 0.0002$) and cathodal tDCS ($p < 0.0001$). After 20 min of anodal tDCS, CSD velocity was increased in the first CSD recording by 0.35 mm/min as compared to a baseline CSD velocity of 3.14 mm/min (Fig. 2a). After this initial increase, CSD velocity returned to baseline level and then further decreased slightly beneath the baseline level. At

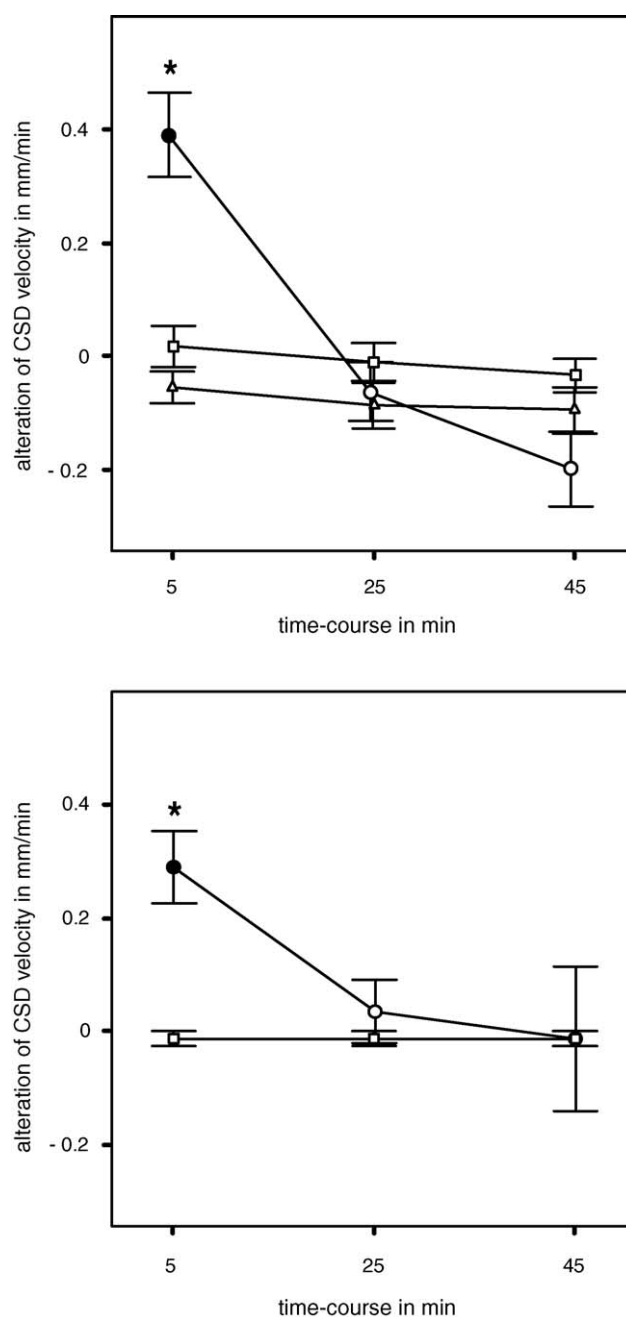


Fig. 2. (a) Time course of the after-effects on the propagation velocity of CSD induced by 20 min of tDCS at a current strength of 200 μ A. Data are mean deviations from baseline CSD velocity expressed in mm/min ($\pm$ S.E.M.). Anodal tDCS (circles) produces a significant increase in CSD velocity, which is present during the first post-tDCS CSD recording. In contrast, cathodal (squares) or sham tDCS (triangles) do not lead to a significant alteration of CSD velocity at any time point. Asterisks indicate significant deviations from pre-tDCS baseline CSD velocity. Closed symbols indicate significant differences of anodal tDCS as compared to the respective time bins of sham and cathodal tDCS (Scheffé test, two-tailed, $p < 0.05$). Time point 0 is immediately after the end of the tDCS. (b) In the control experiment the effects of 20 min of anodal tDCS are recorded between the tDCS electrode (circles) as well as between the two frontal electrodes anterior to the tDCS electrode (squares). Data are mean deviations from baseline CSD velocity expressed in mm/min ($\pm$ S.E.M.). The anodal tDCS-induced increase of CSD velocity is only seen under the tDCS electrode. Asterisks indicate significant deviations from pre-tDCS baseline CSD velocity. Closed symbols indicate significant elevation of the CSD velocity recorded between the tDCS electrode as compared to the frontal CSD recording sites (Scheffé test, two-tailed, $p < 0.05$).

this last recording time-point, CSD velocity was not significantly decreased when compared to baseline level ($p = 0.3837$), sham ($p = 0.6933$) or cathodal stimulation ($p = 0.9854$). As revealed by post hoc testing, cathodal tDCS did not lead to a significant alteration of CSD velocity at any time point in the post-tDCS CSD recordings, when compared to baseline or to CSD velocity after sham stimulation.

In the control experiment, where CSD was recorded over two cortical areas (one under and the other anterior to the tDCS electrode) after anodal tDCS, CSD velocity is increased in the first post anodal-tDCS recording, but only under the tDCS electrode (Fig. 2b). ANOVA revealed a main effect of time ($F = 4.1$, d.f. = 3, $p < 0.043$) but not for the recording site ($F = 4.58$, d.f. = 3, $p = 0.172$). However, a significant interaction was calculated between recording site and time ($F = 4.58$, d.f. = 3 $p = 0.033$), which indicates that the time-course of the CSD velocity is significantly different at the two recording sites. This is confirmed by the post hoc testing, which revealed a significantly elevated CSD velocity only in the first post-tDCS CSD that was recorded under the tDCS electrode (Fig. 2b).

Finally, histological examination of the cresyl violet preparations, showed no tDCS-induced histopathological alteration of the cortex in any of the tDCS treated animals.

We present here the first in vivo approach determining the *after-effects* of tDCS on the propagation velocity of CSD, a phenomenon that is commonly associated with the pathophysiological mechanism of migraine aura [20]. In addition to facilitating, triggering and blocking CSD effects, which are effects known to result *during* DC stimulation [8,19], we report here on alterations of CSD properties that are still present after the termination of the DC stimulation.

The principle finding of the present study is that 20 min of anodal tDCS at a current strength of 200 μ A is capable of inducing a localized increase of CSD velocity in the rat cortex. Interestingly, this acceleration is present about 5 min after the termination of tDCS. In contrast to the after-effects of anodal stimulation, cathodal tDCS of the same duration and intensity did not produce a significant alteration of CSD propagation velocity in our experiments.

Usually DC stimulation is applied through intracortical or epidural electrodes. To achieve conditions more similar to clinical tDCS, we developed a method for transcranial stimulation in the rat. This montage has the advantage that the place of stimulation as well as the current density is well defined and does not change during the experiment. However, unlike tDCS in the clinical setting, where the DC stimulation is applied via two head electrodes, in our animal model a conducting rubber plate was fixed to the chest to serve as the second electrode. A montage with two epicranial electrodes would favour a bypassing of the currents. Moreover, our *unipolar* setting provides for a perpendicular current flow to the cortex surface, so that those neurons, which are oriented along this axis, are affected by the DC stimulation [24]. Finally, the use of a *unipolar* epicranial DC electrode allowed us to stimulate the cortex between the two CSD recording sites without interfering with the recording or induction of the CSD a few mm away from the stimulated cortex. Indeed, our control experiment demonstrates that our

unipolar epicranial electrode assembly is suitable to stimulate the cortex effectively between two CSD recording sites.

Early animal studies have shown that anodal DC stimulation produces neuronal membrane depolarisation [18]. This depolarisation is associated with an increase in spontaneous spiking frequency and is responsible for the effects *during* as well as *after* the stimulation [4]. We have previously shown in pharmacological tDCS studies that a similar mechanism may apply for the after-effects on cortical excitability by anodal tDCS in humans: polarity-driven membrane depolarisation would increase spontaneous spiking activity, which in turn would lead to an increased pre-synaptic input and to a NMDA receptor-mediated upregulation of synaptic strength [12]. Analogous to this condition, we believe that the anodal tDCS-induced after-effect acceleration of CSD velocity is caused by a tDCS-related neuronal membrane depolarisation, which results in an increase of synaptic strength that is associated with an increase in cortical excitability. A similar, but more stable increase of CSD propagation velocity was achieved by repeated epidural application of 20 Hz electrical stimulation as reported recently [7]. It has been suggested that these effects are based on a change of synaptic strength that is achieved in this case by repeated cortical electrical stimulation. A lasting change of cortical excitability seems to represent a common basis of these stimulation-induced neuroplastic changes in CSD velocity.

There is some more evidence that CSD propagation velocity correlates with or represents an index for cortical excitability. Similar to cortical excitability, CSD propagation is affected by changes in the level of ions and of neurotransmitters that control cortical excitability, like glutamate or GABA. Accordingly, ethanol, a GABAergic inhibitor, has been shown to decrease CSD propagation velocity [22]. CSD susceptibility and propagation velocity are also affected in other conditions that are associated with an alteration of cortical excitability, like disturbances in the blood glucose level [5], changes of ion concentration [8] or excitatory amino acids [13]. But most interestingly, CSD propagation and susceptibility is increased in a mouse model of familiar hemiplegic migraine [25]. Again, this change in CSD properties accompanies an increased cortical excitability that also has been found in the occipital cortex of migraine patients by assessing phosphene thresholds [3]. Interestingly, tDCS is capable of inducing transient alterations in phosphene thresholds. Anodal tDCS decreases phosphene thresholds while cathodal tDCS results in the opposite effect [1]. It is exactly this favourable effect of cathodal tDCS on the excitability of V1, which leads to the reasonable assumption that cathodal tDCS could be therapeutically effective in migraineurs. In healthy subjects, cathodal tDCS induces a lasting decrease of cortical excitability [14]. Applied to the primary visual cortex in migraineurs, repetitive cathodal tDCS could, analogous to preliminary reports on patients suffering from major depression or stroke [6,9], counteract the regional cortical hyperexcitability in these patients lastingly and could thereby decrease the frequency of their migraine attacks.

To exclude general brain activation by tDCS, e.g. by altering the activity of modulatory brainstem nuclei, we added a third CSD recording electrode in a control experiment with 4 animals

and measured the CSD velocity at a region 4 mm distant from the tDCS electrode, in addition to the measurements across the area under the tDCS electrode. The results show that CSD velocity is only altered under the tDCS electrode but not in the cortex area rostral from the tDCS electrode demonstrating that the tDCS effect is a localized one and is most likely of cortical origin.

The effect of anodal tDCS on the CSD velocity is present at higher stimulation intensities as compared to the excitability changes induced in human tDCS studies [15]. This may be due to a disadvantageous position of the electrode, which is critical for the induction of tDCS-induced neuroplasticity [16,24].

In contrast to anodal tDCS, cathodal stimulation did not affect CSD velocity in our rat model. The most likely explanation is the use of anaesthetics in our experiments. While the polarity-specific tDCS effects in the human cortex are obtained in awake subjects, the epicortical recording of CSD requires the animals to be under deep anaesthesia. The anaesthetics may interfere with CSD properties. Especially, a decrease of cortical excitability due to the anaesthetics would in all probability result in a bottom effect, so that cathodal tDCS would not decelerate the CSD propagation velocity any further than the anaesthetics.

Undesired histopathological alterations of stimulated brain tissue are presently considered unlikely for several reasons. Cortical and subcortical stroke lesions result in no increase, or even a decrease in CSD propagation [21], while anodal tDCS in the present study induces an increase of CSD velocity. In addition, the latter effects are reversible, which again argues for functional effects. In keeping with these points, we could rule out tDCS-related histopathological alterations by histological evaluation of all rat brains.

We demonstrate that tDCS interferes with the propagation velocity of CSD in a focal and polarity-specific way that lasts beyond the termination of tDCS. Since an increased CSD velocity seems to reflect an elevated cortical excitability [7] and correlates with a decreased threshold for CSD induction [25], anodal tDCS may, in addition to acceleration, facilitate the elicitation of CSD. Theoretically, anodal tDCS may even elicit a CSD or a migraine attack under pathological conditions. Therefore, anodal tDCS should be applied carefully in humans. Special care should be taken in migraine patients, particularly when combining a preconditional anodal tDCS with rTMS or theta-burst stimulation, which may easily provoke a migraine attack in these patients.

Acknowledgements

D.L. was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LI 1016/3-1), F.F. was supported by a grant within the Harvard Medical School Scholars in Clinical Science Program (NIH K30 HL04095-03); R.C.A.G. is research fellow of the Brazilian Agency CNPq (# 30.7846/2004-0).

References

- [1] A. Antal, T.Z. Kincses, M.A. Nitsche, W. Paulus, Manipulation of phosphene thresholds by transcranial direct current stimulation in man, *Exp. Brain Res.* 150 (2003) 375–378.
- [2] A. Antal, M.A. Nitsche, W. Kruse, T.Z. Kincses, K.P. Hoffmann, W. Paulus, Direct current stimulation over V5 enhances visuomotor coordination by improving motion perception in humans, *J. Cogn. Neurosci.* 16 (2004) 521–527.
- [3] S.K. Aurora, Y. Cao, S.M. Bowyer, K.M. Welch, The occipital cortex is hyperexcitable in migraine: experimental evidence, *Headache* 39 (1999) 469–476.
- [4] L.J. Bindman, O.C.J. Lippold, J.W.T. Redfearn, Long-lasting changes in the level of the electrical activity of the cerebral cortex activity produced by polarizing currents, *Nature* 196 (1962) 584–585.
- [5] R.R. Costa-Cruz, R.C. Guedes, Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats, *Neurosci. Lett.* 303 (2001) 177–180.
- [6] F. Fregni, P.S. Boggio, M. Nitsche, M.A. Marcolin, S.P. Rigonatti, A. Pascual-Leone, Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation, *Bipolar disorders*, in press.
- [7] F. Fregni, K.K. Monte-Silva, M.B. Oliveira, S.D. Freedman, A. Pascual-Leone, R.C. Guedes, Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation, *Eur. J. Neurosci.* 21 (2005) 2278–2284.
- [8] B. Grafstein, Mechanism of spreading cortical depression, *J. Neurophysiol.* 19 (1956) 154–171.
- [9] F. Hummel, P. Celnik, P. Giraux, A. Floel, W.H. Wu, C. Gerloff, L.G. Cohen, Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke, *Brain* 128 (2005) 490–499.
- [10] M. Lauritzen, Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory, *Brain* 117 (Pt. 1) (1994) 199–210.
- [11] A.A.P. Leao, Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J. Neurophysiol.* 7 (1944) 359–390.
- [12] D. Liebetanz, M.A. Nitsche, F. Tergau, W. Paulus, Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability, *Brain* 125 (2002) 2238–2247.
- [13] H. Martins-Ferreira, M. Nedergaard, C. Nicholson, Perspectives on spreading depression, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32 (2000) 215–234.
- [14] M.A. Nitsche, M.S. Nitsche, C.C. Klein, F. Tergau, J.C. Rothwell, W. Paulus, Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex, *Clin. Neurophysiol.* 114 (2003) 600–604.
- [15] M.A. Nitsche, W. Paulus, Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans, *Neurology* 57 (2000) 1899–1901.
- [16] M.A. Nitsche, W. Paulus, Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation, *J. Physiol.* 527 (2000) 633–639.
- [17] M.A. Nitsche, A. Schauenburg, N. Lang, D. Liebetanz, C. Exner, W. Paulus, F. Tergau, Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human, *J. Cogn. Neurosci.* 15 (2003) 619–626.
- [18] D.P. Purpura, J.G. McMurtry, Intracellular activities and evoked potential changes during polarisation of motor cortex, *J. Neurophysiol.* 28 (1965) 166–185.
- [19] F. Richter, R. Fechner, W. Haschke, Initiation of spreading depression can be blocked by transcortical polarization of rat cerebral cortex, *Int. J. Neurosci.* 86 (1996) 111–118.
- [20] M. Sanchez-del-Rio, U. Reuter, Migraine aura: new information on underlying mechanisms, *Curr. Opin. Neurol.* 17 (2004) 289–293.
- [21] K. Shimizu, R. Veltkamp, D.W. Busija, Characteristics of induced spreading depression after transient focal ischemia in the rat, *Brain Res.* 861 (2000) 316–324.
- [22] J. Sonn, A. Mayevsky, The effect of ethanol on metabolic, hemodynamic and electrical responses to cortical spreading depression, *Brain Res.* 908 (2001) 174–186.
- [23] H.A. Teive, P.A. Kowacs, P. Maranhao Filho, E.J. Piovesan, L.C. Werneck, Leao's cortical spreading depression: from experimental

- “artifact” to physiological principle, *Neurology* 65 (2005) 1455–1459.
- [24] C.A. Terzuolo, T.H. Bullock, Measurement of imposed voltage gradient adequate to modulate neuronal firing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 42 (1956) 687–694.
- [25] A.M. van den Maagdenberg, D. Pietrobon, T. Pizzorusso, S. Kaja, L.A. Broos, T. Cesetti, R.C. van de Ven, A. Tottene, J. van der Kaa, J.J. Plomp, R.R. Frants, M.D. Ferrari, A. Cagnaia knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression, *Neuron* 41 (2004) 701–710.

Brief Communication

Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression

Felipe Fregni^{a,*}, David Liebetanz^b, Katia K. Monte-Silva^c, Manuella B. Oliveira^c,
Angela A. Santos^c, Michael A. Nitsche^b, Alvaro Pascual-Leone^a, Rubem C.A. Guedes^c

^a Center for Noninvasive Brain Stimulation, Harvard Medical School and Beth Israel Deaconess Medical Center,
330 Brookline Ave, KS 452, Boston, MA 02215, USA

^b Department of Clinical Neurophysiology, Georg-August-University, Goettingen, Germany

^c Laboratory of Neurophysiology and Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco State, Recife, Brazil

Received 12 July 2006; revised 28 September 2006; accepted 29 September 2006

Available online 17 November 2006

Abstract

We have recently shown that two techniques of brain stimulation – repetitive electrical stimulation (ES) (that mimics transcranial magnetic stimulation) and transcranial direct current stimulation (tDCS) – modify the velocity of cortical spreading depression (CSD) significantly. Herein we aimed to study the effects of these two techniques combined on CSD. Thirty-two Wistar rats were divided into four groups according to the treatment: sham tDCS/sham ES, sham tDCS/1 Hz ES, anodal tDCS/1 Hz ES, cathodal tDCS/1 Hz ES. Our findings show that 1 Hz ES reduced CSD velocity, and this effect was modified by either anodal or cathodal tDCS. Anodal tDCS induced larger effects than cathodal tDCS. Hereby CSD velocity was actually increased significantly after anodal tDCS/1 Hz ES. Our results show that combining two techniques of brain stimulation can modify significantly the effects of ES alone on cortical excitability as measured by the neurophysiological parameter of cortical spreading depression and therefore provide important insights into the effects of this new approach of brain stimulation on cortical activity.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cortical spreading depression; Cortical electrical stimulation; Transcranial direct current stimulation; Transcranial magnetic stimulation; Wistar rats; Cortical excitability

We have recently shown that cortical stimulation with repetitive electrical stimulation (ES) (a technique that mimics the effects of transcranial magnetic stimulation) and with transcranial direct current stimulation (tDCS) results in a significant change in the velocity of the phenomenon of cortical spreading depression (Fregni et al., 2005a; Liebetanz et al., 2006). Because the interest in the clinical application of brain stimulation has been increasing and recent studies investigating the use of both techniques in combination in humans subjects (Siebner et al., 2004; Lang et al., 2004) showed that priming rTMS treatment with tDCS modifies the effects of rTMS on motor cortex excitability, the further exploration of the neurophysiological effects of this strategy of brain stimulation is warranted. Therefore we aimed to investigate the effects of preconditioning of cortical electrical stimulation with tDCS on an animal model of cortical

spreading depression (CSD), comparing the effects of 1 Hz ES (preconditioned with sham tDCS) vs. 1 Hz ES preconditioned with either anodal or cathodal tDCS on the phenomenon of CSD.

In this study, we used CSD as an index of brain function. This phenomenon was first described by Leão (Leao, 1944; Teive et al., 2005) and it is characterized by massive alterations in cerebrocortical ion homeostasis in response to the stimulation of a point of the brain tissue (Somjen, 2005). These alterations result in a wave of neuronal depolarization that propagates at a rate of 2–5 mm min⁻¹ across the cortical surface, accompanied by reversible electroencephalogram (EEG) suppression and a negative deflection of the direct current potential (Guedes and Cavalheiro, 1997). CSD has been extensively studied in several conditions of brain function alteration, providing important information about brain activity, therefore being a useful index to study brain function experimentally (Guedes, 1984; Guedes, 2005). Finally, we used repetitive electrical stimulation, because the technical limitations of rTMS in rats result in a diffuse

* Corresponding author. Fax: +1 617 975 5322.

E-mail address: ffregni@bidmc.harvard.edu (F. Fregni).

stimulation throughout the cortex and is thus not suitable for this study.

Thirty-two male adult Wistar rats (365.5 ± 7.8 g, mean $\pm$ S.E.M.) were used in this experiment. They were housed individually under controlled temperature and on a 12 h light/dark cycle (lights on at 6 h A.M.) with free access to rat chow pellets and tap water. All rats were cared for and used in strict accordance to the PHS Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Importantly, all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Pernambuco State, Brazil, where the experiments were carried out.

The rats were randomized into four different groups according to the stimulation protocols: sham tDCS followed by sham ES (represented by sham tDCS/sham ES), sham tDCS followed by 1 Hz ES (represented by sham tDCS/1 Hz ES), anodal tDCS followed by 1 Hz ES (represented by anodal tDCS/1 Hz ES) and cathodal tDCS followed by 1 Hz ES (represented by cathodal tDCS/1 Hz ES). Initially, tDCS electrodes implantation and baseline CSD recording session were performed. To perform stimulation and CSD recording, rats were anesthetized with a mixture of urethane and chloralose (1.0 g/kg plus 0.04 g/kg IP, respectively; one-third of the initial dose as supplement, if necessary) and placed in a stereotactic frame in a flat-skull position. For CSD recording, two holes (3–4 mm diameter) were drilled manually over the right hemi-

sphere (Fig. 1). They were aligned in the parieto-frontal direction, located either 1 mm posterior to the coronal suture or 1 mm anterior to the lambdoid suture, and parallel to the midline (2 mm lateral to the sagittal suture). A small plastic jacket was positioned over the right parietal cortex just between the two boreholes and fixed with a coating of a glass ionomer cement (Ketac Cem, ESPE Dental AG, Seefeld, Germany). The jacket was filled with saline solution (0.9% NaCl) to establish a defined contact area (7 mm^2) and, thus used as one of the electrodes for tDCS. After the tDCS electrode implant, CSD recording, tDCS and ES were performed.

To elicit CSD, we used KCl as this substance is effective in causing a massive neuronal depolarization. Recording was made with two Ag–AgCl agar-Ringer type electrodes—gently placed on the intact dura mater, in each one of the holes situated anterior and posterior to the DC-electrode, respectively. CSD induction was started after 30 min of baseline recording. It was elicited at 20 min intervals by 1 min application of a cotton ball (1–2 mm diameter), soaked in 2% KCl solution, to the anterior hole. The cortical spontaneous electrical activity (electrocorticogram) and the slow potential change accompanying CSD were continuously recorded for 80 min against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bones (Fig. 1). CSD velocity of propagation was indexed by the velocity of propagation of the slow potential change and calculated from the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical electrodes.

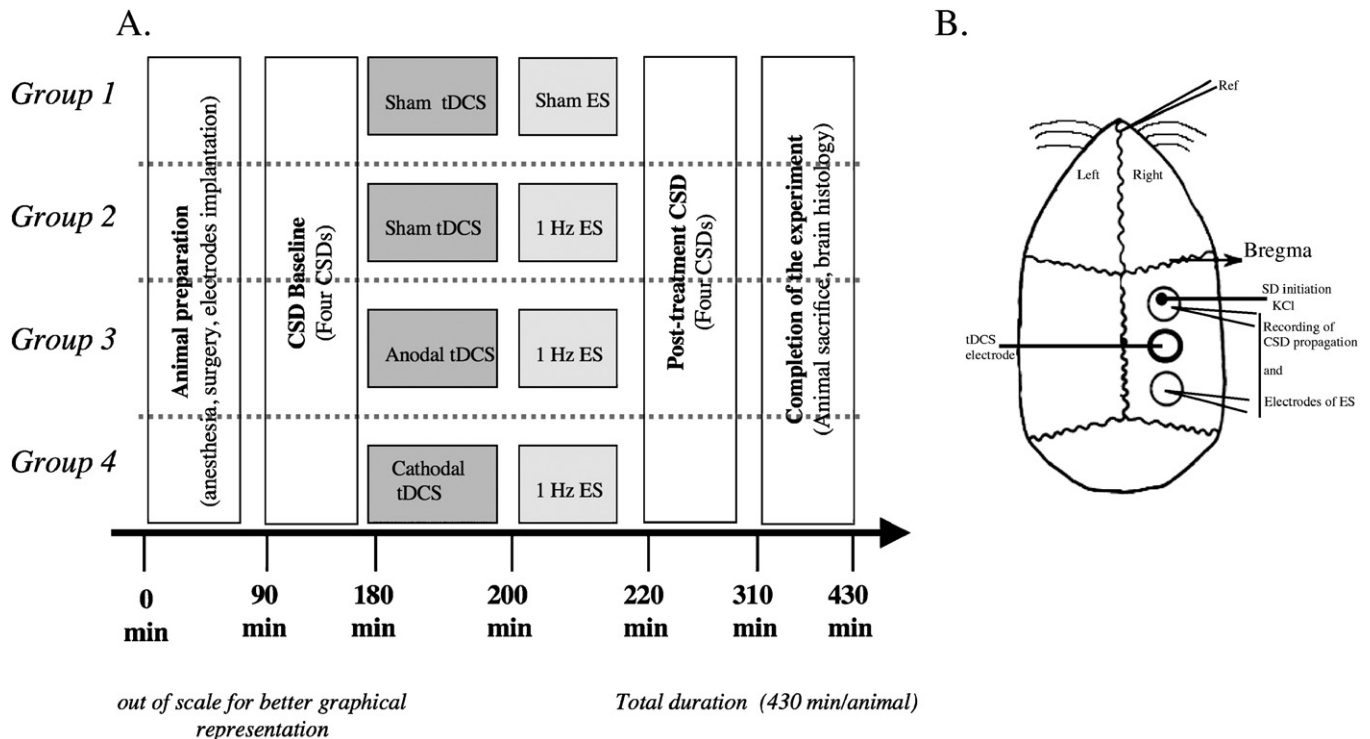


Fig. 1. A—This diagram summarizes the timeline for our experiment. Initially the animals were operated to implant electrodes for cortical spreading depression (CSD) recording and transcranial direct current stimulation (tDCS)/electrical stimulation (ES). We then record baseline CSD, applied tDCS (sham, anodal or cathodal), ES (1 Hz or sham) and recorded post-treatment CSD. At the end, the animals were sacrificed and the brains were removed for histological analysis. B—Schematic illustration showing the location of the two holes in each hemisphere for CSD recording, the location of epidural KCl application (frontal hole), the location of the two electrodes (for CSD recording and ES), the nasal reference for cortical spreading depression (CSD) recording and the location of the tDCS stimulating electrode (between two holes of CSD recording).

For transcranial direct current stimulation, we used a specially developed, battery-driven, constant current stimulator (Schneider Electronic, Gleichen, Germany) with a maximum output of 10 mA that transferred electric current to the electrode on the cranium (jacket fixed on the parietal cortex filled with saline solution—area of 7 mm²) and to the electrode placed onto the ventral thorax that served as a counter electrode (large, conventional rubber plate electrode –10.5 cm² (Physiomed Elektromedizin AG, Schnaittach, Germany)). For anodal stimulation, the electrode on the cranium was the anode and the electrode on the thorax the cathode, whereas for cathodal stimulation, the connections were reversed. A constant current of 0.2 mA intensity (current density of 2.86 mA/cm²) was applied for 20 min. For sham stimulation, the electrodes were placed in the same position; however, the stimulator was turned off after 30 s, similarly to the method used in human studies.

For repetitive electrical stimulation, we used the recording CSD electrodes to deliver repetitive electrical stimulation. This procedure assured that CSD would be recorded in the brain area that received ES. Electrical stimulation was delivered by an electrical stimulator (Insight, Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brazil) and applied using the following parameters: 1 Hz continuous stimulation for 20 min (total of 1200 pulses using a pulse intensity of 0.6 mA and pulse duration of 5 ms). We used the same stimulation protocol as in a previous study that evaluated the effects of repetitive electrical stimulation on CSD in Wistar rats (Fregni et al., 2005a) and indeed showed that 0.6 mA corresponds to a suprathreshold stimulation (approximately 120% of the motor threshold (MT)).

At the end of the experiment, brains were removed and serial frozen sections were cut using a microtome, mounted on glass slides, and stained with cresyl violet. The slices were examined under a light-microscope to evaluate histological lesions induced by either tDCS or ES.

Statistical analyses were done with SAS statistical software (version 8.0, Cary, North Carolina, USA). The main outcome of this study was the CSD velocity change—defined as the difference between pre- and post-stimulation CSD velocity in the same animal. Because there were 4 different groups of stimulation (sham tDCS/sham ES, sham tDCS/1 Hz ES, anodal tDCS/1 Hz ES, cathodal tDCS/1 Hz ES), we used analysis of variance to detect whether there was an overall significant effect of stimulation condition on CSD velocity. When appropriate, post-hoc comparisons were carried out using Fisher LSD correction for multiple comparisons. Statistical significance refers to a two-tailed *p* value < 0.05.

A one-way ANOVA showed that the main effect of stimulation condition was significant ($F=6.37$, $df=3,21$, $p=0.003$). After sham tDCS/1 Hz ES, a decrease in the CSD velocity of 6.9% ($\pm 1.9\%$) was observed as compared to baseline. Post-hoc comparisons furthermore showed that CSD velocity changes after sham tDCS/1 Hz ES were significantly different when compared to sham tDCS/sham 1 Hz ($p=0.011$), anodal tDCS/1 Hz ES ($p=0.0003$) and cathodal tDCS/1 Hz ES ($p=0.045$).

The effects of anodal stimulation had a larger magnitude as compared to cathodal stimulation using sham stimulation as the

reference group (i.e., anodal vs. sham compared with cathodal vs. sham), whereas anodal stimulation changed the velocity of CSD as compared with sham tDCS/1 Hz ES in 14.4% (CSD velocity (mm/min) after anodal tDCS/1 Hz ES: 3.41 (± 0.39) and after sham tDCS/1 Hz ES: 2.98 (± 0.28)), this difference was only 4.3% for the same comparison with cathodal stimulation (CSD velocity after cathodal tDCS/1 Hz ES: 3.11 (± 0.26)). There was also a significant difference ($p=0.041$) between the effects of 1 Hz ES preceded by anodal vs. 1 Hz ES preceded by cathodal stimulation on CSD (Fig. 2). In addition anodal tDCS/1 Hz ES resulted in a significant increase in the velocity of CSD propagation as compared with baseline (see Table 1 for details).

Finally, we tested whether sham tDCS/sham ES resulted in CSD velocity change. This analysis revealed no difference between the post-stimulation CSD compared to pre-stimulation CSD (change of $-0.5\% \pm 0.6\%$, $p=0.75$). Histological examination showed that there were no histological lesions induced by the electric current from either tDCS or ES and combination of both techniques.

The results of this study extend our previous study showing that the combination of tDCS with ES can modify the effects of ES alone. Furthermore this effect depends on the direction of the current such as that anodal stimulation had a larger effect on CSD changes modulated by ES.

We showed that preconditioning of electrical stimulation with anodal or cathodal tDCS modulates the after-effects (i.e., the modulatory effects that are observed beyond the stimulation period) of 1-Hz ES on CSD. Although these findings can be explained by different mechanisms, we hypothesize that the most likely mechanism is that different effects of anodal and cathodal tDCS on membrane polarization are responsible for the results of subsequent ES on CSD velocity. Low-frequency ES alone induced long-term-depression (LTD)-like effects in our

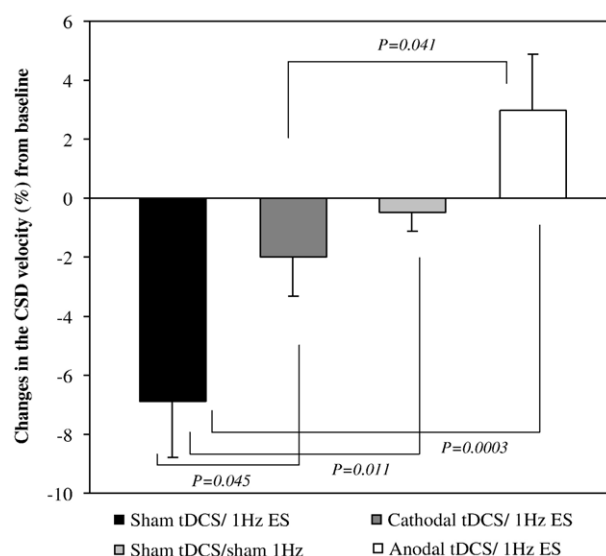


Fig. 2. Changes in the CSD velocity compared to baseline (%) can be observed after sham tDCS/1 Hz-ES (black column); cathodal tDCS/1 Hz-ES (dark grey column); sham tDCS/sham ES (light grey column) and anodal tDCS/1 Hz ES (white column). Each column represents mean velocity of CSD changes from baseline. Error bars indicate S.E.M.

Table 1
CSD velocity before and after stimulation

Treatment group	CSD velocity (mm min ⁻¹) (±S.D.)	
	Baseline	After stimulation
Sham tDCS/Sham ES	3.26 (±0.32)	3.25 (±0.34)
Sham tDCS/1 Hz ES	3.21 (±0.29)	2.98 (±0.28)
Cathodal tDCS/1 Hz ES	3.17 (±0.25)	3.11 (±0.26)
Anodal tDCS/1 Hz ES	3.31 (±0.28)	3.41 (±0.39)

tDCS—transcranial direct current stimulation; ES—electrical stimulation; CSD—cortical spreading depression.

study, which is in accordance with previous animal studies (Malenka and Bear, 2004). On the other hand, anodal tDCS might have depolarized postsynaptic membranes relevantly and thus favored long-term-potential (LTP)-like effects of the same ES protocol, as it was demonstrated in animal experiments that postsynaptic depolarization combined with low-frequency electrical stimulation generates LTP (Fregni et al., 1994). Conversely, a postsynaptic hyperpolarization generated by cathodal tDCS might have diminished LTD-like effects of our ES protocol, since a slight postsynaptic depolarization, however smaller than the amount of depolarization needed for LTP-induction, is also a pre-requisite for most LTD-inducing protocols (Malenka and Bear, 2004). For us, this hypothesis seems to be the most parsimonious one to explain the results, because it is applicable for the effects of anodal as well as cathodal tDCS on ES. Therefore the results of this study shed light on the mechanisms and effects of two techniques of brain stimulation on cortical physiology.

The results of this study are important and advance the knowledge in the field of brain stimulation for several reasons: (1) we showed, by neurophysiological data, that tDCS is a powerful method of brain stimulation that when combined with ES changes its effects; (2) we confirmed and extended the notion that the effects of tDCS are specific to the polarity of stimulation using another neurophysiologic method of assessment – cortical spreading depression – as anodal and cathodal stimulation yield different results as indexed by cortical spreading depression; and (3) anodal tDCS in combination with 1 Hz ES changes the velocity of CSD propagation by 14.4%, and thus to a greater degree than anodal tDCS alone (change of 11.1%), as shown in our previous study (Liebetanz et al., 2006) and therefore suggesting that this combined approach of brain stimulation might have a greater modulatory impact on brain activity.

Finally, our results might have a potential relevance for the clinical application of brain stimulation in migraine and epilepsy. The phenomenon of cortical spreading depression is associated with these pathologies (Leniger et al., 2003). As we have shown that anodal and cathodal tDCS change the features of CSD induced by repetitive ES, we speculate that tDCS in humans could also shape the likelihood of migraine and epilepsy attacks induced by stimulatory, trigger factors such as sleep deprivation, stress and hypoglycemia.

Although we believe that our results might have a clinical relevance for humans, parameters of DC stimulation were not the same as those used in human studies and thus the transferability of these results for application in humans are

limited. We used a current density several times higher than the one usually used in humans (2.86 mA/cm² (in this study) vs. 0.06 mA/cm²—given a current of 2 mA and an electrode of 35 cm² or 0.03 mA/cm² with a current of 1 mA in humans), the electrode was fixed directly on the skull instead of being applied to the skin (as performed in humans) and the duration of stimulation was 20 min – that is twice the duration used in some human studies (Fregni et al., 2005b; Nitsche and Paulus, 2001) – however, 20 min of stimulation has also been used in other clinical studies (Fregni et al., 2006; Hummel et al., 2005). Although the parameters of stimulation might change the magnitude of its effects, its direction (i.e., facilitation or inhibition) remains the same. Similarly, although electrical stimulation and TMS might be roughly comparable, these two types of stimulation might induce at least gradually different biological effects as epidural electrical stimulation might induce a more focal and deeper stimulation as compared to TMS.

In conclusion, the results of this study show that tDCS alters the subsequent effects of 1 Hz ES on the phenomenon of CSD. Further studies exploring different parameters of stimulation such as the combination of anodal tDCS with high frequency ES are necessary in order to develop this novel strategy of brain stimulation.

Acknowledgments

This work was supported by a grant within the Harvard Medical School Scholars in Clinical Science Program (NIH K30 HL04095-03) to F.F.; R.C.A.G. is research fellow of the Brazilian Agency CNPq (# 30.7846/2004-0).

References

- Fregni, Y., Burke, J.P., Smith, D., Friedlander, M.J., 1994. Temporal covariance of pre- and postsynaptic activity regulates functional connectivity in the visual cortex. *J. Neurophysiol.* 71, 1403–1421.
- Fregni, F., Monte-Silva, K.K., Oliveira, M.B., Freedman, S.D., Pascual-Leone, A., Guedes, R.C., 2005a. Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2278–2284.
- Fregni, F., Boggio, P.S., Nitsche, M., Bero, P., Antal, A., Feredoes, E., Marcolin, M.A., Rigonatti, S.P., Silva, M.T., Paulus, W., Pascual-Leone, A., 2005b. Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp. Brain Res.* 166, 23–30.
- Fregni, F., Boggio, P.S., Lima, M.C., Ferreira, M.J., Wagner, T., Rigonatti, S.P., Castro, A.W., Souza, D.R., Riberto, M., Freedman, S.D., Nitsche, M.A., Pascual-Leone, A., 2006. A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain* 122, 197–209.
- Guedes, R.C., 1984. On some conditions that influence cortical spreading depression. *An Acad. Bras. Cienc.* 56, 445–455.
- Guedes, R.C., 2005. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: Prasad, C. (Ed.), *Nutritional Neuroscience: Overview of an Emerging Field*. CRC Press Nutrition, New York, pp. 39–54.
- Guedes, R.C., Cavalheiro, E.A., 1997. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Res.* 27, 33–40.
- Hummel, F., Celnik, P., Giraux, P., Floel, A., Wu, W.H., Gerloff, C., Cohen, L.G., 2005. Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. *Brain* 128, 490–499.
- Lang, N., Siebner, H.R., Ernst, D., Nitsche, M.A., Paulus, W., Lemon, R.N., Rothwell, J.C., 2004. Preconditioning with transcranial direct current stimulation sensitizes the motor cortex to rapid-rate transcranial magnetic

- stimulation and controls the direction of after-effects. *Biol. Psychiatry* 56, 634–639.
- Leao, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359–390.
- Leniger, T., Diener, H.C., Hufnagel, A., 2003. Altered cerebral excitability and spreading depression. Causes for the comorbidity of epilepsy and migraine? *Nervenarzt* 74, 869–874.
- Liebetanz, D., Fregni, F., Monte-Silva, K.K., Oliveira, M.B., Amancio-dos-Santos, A., Nitsche, M.A., Guedes, R.C., 2006. After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neurosci. Lett.* 398, 85–90.
- Malenka, R.C., Bear, M.F., 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21.
- Nitsche, M.A., Paulus, W., 2001. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology* 57, 1899–1901.
- Siebner, H.R., Lang, N., Rizzo, V., Nitsche, M.A., Paulus, W., Lemon, R.N., Rothwell, J.C., 2004. Preconditioning of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation with transcranial direct current stimulation: evidence for homeostatic plasticity in the human motor cortex. *J. Neurosci.* 24, 3379–3385.
- Somjen, G.G., 2005. Aristides Leao's discovery of cortical spreading depression. *J. Neurophysiol.* 94, 2–4.
- Teive, H.A., Kowacs, P.A., Maranhao Filho, P., Piovesan, E.J., Werneck, L.C., 2005. Leao's cortical spreading depression: from experimental "artifact" to physiological principle. *Neurology* 65, 1455–1459.