

**KÁTIA KARINA DO MONTE SILVA MACHADO**

**NUTRIÇÃO, ELETROESTIMULAÇÃO PERIFÉRICA E  
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL:  
ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL  
EM RATOS JOVENS E ADULTOS**

**RECIFE  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**KÁTIA KARINA DO MONTE SILVA MACHADO**

**Nutrição, Eletroestimulação Periférica e Desenvolvimento  
Cerebral: Estudo Eletrofisiológico e Comportamental em  
Ratos Jovens e Adultos**

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

**Orientador: Professor Rubem Carlos Araújo Guedes**

**Recife  
2006**

## Machado, Kátia Karina do Monte Silva

Nutrição, eletroestimulação periférica e desenvolvimento cerebral: estudo eletrofisiológico e comportamental em ratos jovens e adultos. – Recife: O Autor, 2006.

90 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2006.

Inclui bibliografia, anexos.

1. Eletroestimulação periférica . 2. Desnutrição –  
Depressão alastrante. I. Título.

591.13  
314.5939

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

UFPE  
CCS2006-010

**Kátia Karina do Monte Silva Machado**

**Nutrição, Eletroestimulação Periférica e Desenvolvimento Cerebral:  
Estudo Eletrofisiológico e Comportamental em Ratos Jovens e Adultos**

**Banca Examinadora**

*Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa*  
1. Prof. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

*Cláudio Temistocles de Freitas Barbosa*  
2. Prof. Cláudio Temistocles de Freitas Barbosa

*Raul Manhães de Castro*  
3. Prof. Raul Manhães de Castro

**Recife-2006**

## Agradecimentos

A **Deus** pela constante presença em minha vida, ministrando meus planos e guiando meus passos. Pela luz concedida nos momentos de escuridão, pelo conforto nos momentos de desesperos e pela oportunidade da vida.

A **minha família** pelo crédito constante e necessário para enfrentar e saber conviver com as vicissitudes da vida. Sou grata pela compreensão e tolerância das minhas ausências em muitos momentos especiais perdidos em dedicação a este projeto.

Aos **amigos do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT)**, pelo prazer do convívio em clima de amizade e companheirismo.

As minhas estagiárias **Giselle Mirtes, Felícia Leilianne, Elizabete e Maria** pela inestimável cooperação em todas as etapas desta dissertação.

As minhas amigas **Manuela Batista e Ana Virgínia** pelos constantes momentos de amizade, apoio e incentivo.

Em especial, ao meu marido **André Luiz Melo de Albuquerque Machado**, pela compreensão, companheirismo, paciência, amizade e amor, a mim dedicado. Nele encontro sentido para continuar lutando pelos meus objetivos.

Ao meu orientador, professor, padrinho e amigo Prof. **Rubem Carlos Araújo Guedes**, meu agradecimento especial, pelos incentivos e ensinamentos. Sou grata pelo meu direcionamento profissional, que inspirado nele foi traçado desde a Graduação.

Ao **CNPq**, pela concessão de três anos de bolsa de iniciação científica (PIBIC), cujo suporte financeiro foi indispensável a minha formação.

A **Capes** pela bolsa concedida durante o curso de Mestrado em Nutrição.

Por fim, agradeço **a todos** que participaram da minha caminhada, criticando-me incentivando-me, auxiliando-me, que seria impossível e injusto nomeá-los particularmente, pois certamente incorreria no erro da omissão. Abraço a todos, agradecida e comovida por ter sempre recebido tanto e dado tão pouco.

*A estrada para o sucesso não é uma reta...  
Há uma curva chamada fracasso...  
Um trevo chamado confusão...  
Mas se você tiver um estepe chamado determinação...  
Um motor chamado perseverança...  
Um seguro chamado fé...  
E um motorista chamado JESUS...  
Você chegará a um lugar chamado Sucesso!*

## RESUMO

A desnutrição e a ativação de vias sensoriais no início da vida influenciam o desenvolvimento neural e o comportamento exploratório de mamíferos. Este trabalho investigou os efeitos da eletroestimulação periférica (EP) precoce sobre a depressão alastrante (DA) e o comportamento exploratório em ratos Wistar normonutridos (23% de proteína) e desnutridos no início da vida (8% de proteínas). Do 7º ao 28º dia pós-natal, os ratos receberam sessões diárias de EP (pulsos repetitivos de onda quadrada, duração: 1,5 ms; intensidade: 10-40V), com frequências de 2 ou 60Hz (grupos 2 e 60, respectivamente). Esta EP foi assimétrica (somente no lado esquerdo do corpo), aplicada por dois eletrodos circundando as patas. Os animais controles, grupo “sham”, tinham eletrodos similares colocados nas patas esquerdas, mas não foram estimulados. Os ratos foram avaliados aos 35-45 dias (DA) e 85-105 dias de idade (DA e comportamento exploratório). A DA foi deflagrada, sob anestesia, na região parietal posterior e sua propagação foi registrada em dois pontos fronto-parietais do mesmo hemisfério, por duas horas. Em seguida, os eletrodos foram movidos para o outro hemisfério e o registro da DA foi realizado por mais duas horas. As velocidades de propagação da DA foram calculadas com base na distância entre os eletrodos registradores e no tempo gasto pela DA para percorrer esta distância. O comportamento exploratório foi observado, por 5 minutos, em animais acordados, no aparelho campo aberto. Deambulação, frequência das respostas de levantar-se e de deslocar-se ao centro do campo, bem como o número de bolos fecais, foram quantificados. Nos ratos normonutridos em ambas as idades, no grupo 2Hz, mas não 60Hz, a EP reduziu as velocidades da DA no hemisfério contralateral ao lado do corpo estimulado, quando comparado ao “sham”. Este efeito foi encontrado, nos ratos desnutridos, para ambos as frequências, EP com 2Hz e 60Hz. Nenhuma diferença inter-hemisférica foi vista nos grupos “sham”. O comportamento exploratório aumentou no grupo normonutrido EP com 2Hz. Os resultados sugerem um efeito da EP dependente da frequência e do estado nutricional sobre a DA e sobre o comportamento exploratório. Os mecanismos subjacentes ainda são insuficientemente entendidos, mas processos plásticos como ativação de receptores N-metil-D-aspartato, inibição GABAérgica, e potenciação e depressão a longo prazo podem estar envolvidos. Os dados são relevantes por reforçar o uso terapêutico da estimulação elétrica em pacientes neurológicos, bem como o uso da DA como um modelo para estudos experimentais desses recursos terapêuticos.

Palavras Chaves: Eletroestimulação periférica, Depressão alastrante, Desnutrição, Desenvolvimento cerebral, Neuroplasticidade.



## ABSTRACT

Both malnutrition and activation of sensory afferences early in life are known to influence mammal neural development and exploratory behavior. This work investigated the early effects of peripheral electrostimulation (PE) on cortical spreading depression (SD) and on exploratory behavior in Wistar well-nourished (23% protein diet) and early malnourished (8% protein) rats. From postnatal days 7 to 28, rats received daily PE sessions (repetitive square-wave pulses; duration: 1,5 ms; intensity: 10-40V), with frequencies of 2Hz or 60Hz (respectively 2- and 60- groups). This PE was asymmetric (only in the left side of the body), delivered by two electrodes attached to the left paws. A control, sham-group, had similar electrodes attached to the left paws, but were not stimulated. Rats were tested at postnatal ages 35-45 days (SD) and 95-105 days (SD and exploratory behavior). SD was elicited, under anesthesia, at one parietal cortical point and its propagation was monitored at 2 fronto-parietal points of the same hemisphere, for 2h. After that, electrodes were moved to the other hemisphere and SD recording was performed for 2 more hours. SD velocities of propagation were calculated based on the interelectrode distance and on the time spent for a SD-wave to cross this distance. Exploratory behavior was observed in awake animals for 5 min in the open field apparatus, and ambulation-, rearing- and crossing-responses, as well as the number of faecal bolus, were quantified. In the well-nourished rats at both age-ranges, 2Hz-, but not 60Hz, PE reduced SD velocities in the hemisphere contralateral to the stimulated body-side, as compared to the Sham group. This effect was found, in the malnourished rats, for both 2Hz- and 60Hz PE. No inter-hemispheric difference was seen in the sham-PE-stimulated groups, concerning SD-effects. Exploratory behavior increased in the well-nourished 2Hz-, but not 60Hz-group, and was not altered in the malnourished rats. The results suggest a frequency- and nutrition-dependent effect of early EP on SD and on exploratory behavior. The underlying mechanisms are still insufficiently understood, but plastic processes as N-methyl-d-aspartate receptor activation, GABAergic inhibition, and long-term potentiation and depression may be involved. Data are considered relevant to support the therapeutic use of electrical stimulation in neurological patients, as well as for the use of SD as a model for experimental studies on that therapeutic resource.

Keywords: Peripheral electrostimulation, Spreading depression, Malnutrition, Brain development, Neural plasticity.

## LISTA DE FIGURAS

1 – Foto da técnica de contenção do animal.....	31
2 - Grupos experimentais.....	32
3 - Aparelho de campo aberto.....	33
4 - Registros eletrofisiológico da depressão alastrante de ratos jovens.....	43
5 - Registros eletrofisiológico da depressão alastrante de ratos adultos.....	44
6 - Velocidades de propagação da depressão alastrante.....	45
7 - Comportamento exploratório.....	46

## LISTA DE TABELAS

1 - Composição da “Dieta de Manutenção do Biotério” ( <b>Labina</b> ).....	26
2 - Composição da “Dieta Básica Regional” ( <b>DBR</b> ).....	27
3 - Evolução ponderal.....	41
4 - Pesos encefálicos.....	42
5 - Velocidade de propagação da depressão alastrante.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ag-AgCl</b>	Prata-Cloreto de prata
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>D</b>	Grupo desnutrido
<b>D-2</b>	Grupo desnutrido eletroestimulado com 2Hz
<b>D-60</b>	Grupo desnutrido eletroestimulado com 60Hz
<b>D-Sham</b>	Grupo desnutrido não estimulado (estimulação fictícia)
<b>DA</b>	Depressão alastrante cortical
<b>DBR</b>	Dieta básica regional
<b>DMB</b>	Dieta de manutenção do biotério
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EC</b>	Estimulação cortical
<b>ECoG</b>	Eletrocorticograma
<b>EP</b>	Eletroestimulação periférica
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>LAFINNT</b>	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
<b>N</b>	Grupo normonutrido
<b>N-2</b>	Grupo normonutrido eletroestimulado com 2Hz
<b>N-60</b>	Grupo normonutrido eletroestimulado com 60Hz
<b>N-Sham</b>	Grupo normonutrido não estimulado (estimulação fictícia)
<b>NMDA</b>	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>V</b>	Volts
<b>VLV</b>	Variação lenta de voltagem

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Desnutrição e Sistema Nervoso.....	12
1.2 Estimulação Sensorial, Sistema Nervoso e Desnutrição.....	13
1.3 Depressão Alastrante, Desnutrição e Eletroestimulação.....	14
1.4 Estimulação Sensorial, Desnutrição e Comportamento.....	17
2 JUSTIFICATIVAS.....	19
3 HIPÓTESES.....	20
4 OBJETIVOS.....	10
4.1 Geral.....	21
4.2 Específicos.....	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1 Animais.....	23
5.2 Grupos Experimentais.....	23
5.2.1 Condição Nutricional.....	23
5.2.2 Eletroestimulação Periférica.....	28
5.3 Análise Comportamental.....	29
5.4 Registro Eletrofisiológico da Depressão Alastrante .....	34
5.5 Determinações Ponderais.....	36
5.5.1 Pesos Corporais.....	36
5.5.2 Pesos Encefálicos.....	36
5.6 Análise Estatística.....	37
6 RESULTADOS.....	28

6.1 Pesos Corporais e Encefálico.....	28
6.2 Velocidade de Propagação da Depressão Alastrante.....	28
6.3 Análise Comportamental.....	39
7 DISCUSSÃO.....	48
8 CONCLUSÕES.....	60
9 PERSPECTIVAS.....	61
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
11 ANEXOS.....	77
11.1 Anexo A-Artigo Publicado 2005.....	78
11.2 Anexo B-Artigo Publicado 2006.....	85

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Desnutrição e sistema nervoso

Apesar da indicação, de estudos da Organização Mundial de Saúde, de que a desnutrição em crianças de países em desenvolvimento vem declinando progressivamente nas duas últimas décadas (ONIS *et al.*, 2000), a desnutrição infantil ainda permanece como um sério problema de saúde pública nestes países, entre os quais se inclui o Brasil. A alta prevalência de desnutrição infantil em várias partes do mundo é preocupante, uma vez que a desnutrição, quando no início da vida, pode levar a alterações estruturais e funcionais altamente desfavoráveis para diversos sistemas orgânicos em desenvolvimento, dentre eles o sistema nervoso (MORGANE *et al.*, 1993). Para este último, a deficiência nutricional será tanto mais danosa quanto mais precoce se estabelecer a desnutrição, pois nessa condição as chances de recuperação total são bastante reduzidas.

Nas fases iniciais da vida, os processos implicados no desenvolvimento cerebral (divisão celular –neurogênese e gliogênese, migração e diferenciação celular, formação da bainha de mielina, de sinapses, síntese e liberação de neurotransmissores) ocorrem com máxima velocidade. Por esse motivo, essa fase é denominada de período de crescimento rápido do cérebro ou também de período crítico, porque nela o sistema nervoso é mais vulnerável à agressões externas, entre elas a deficiência nutricional (DOBBING, 1968). Este período crítico ocorre em épocas distintas nas diversas espécies de animais. Em alguns mamíferos, o desenvolvimento do cérebro começa já na embriogênese e continua durante uma fase relativamente curta da vida pós-natal. Essa fase, em seres humanos, estende-se do terceiro trimestre da gestação até os primeiros

anos de vida pós-natal (2-4 anos). Em cobaias, este período corresponde apenas à vida pré-natal e no rato, coincide com o período de aleitamento (SMART & DOBBING, 1971).

A severidade das alterações induzidas pela desnutrição não só depende do grau de maturidade do sistema nervoso no início da privação, mas também da duração, da intensidade e do tipo de desnutrição. Nessa fase é grande a vulnerabilidade do cérebro, não só às variáveis nutricionais (MORGANE *et al.*, 1993), como também àquelas representadas por deficiência ou excesso de estimulação sensorial (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000). Os efeitos da associação dessas duas variáveis foram estudados neste trabalho, como será descrito adiante.

## 1.2 Estimulação sensorial, sistema nervoso e desnutrição

Como comentado acima, funções neurais básicas, como o processamento de informações sensoriais (por meio dos cinco órgãos dos sentidos) e a percepção das sensações correspondentes, podem ser alteradas, na desnutrição, em extensões variadas e de forma diretamente proporcional à intensidade e à duração da deficiência nutricional (MORGANE *et al.*, 1978; 1993; GUEDES, 2005). Em relação à associação entre desnutrição e estimulação sensorial, evidências do nosso laboratório demonstraram que a magnitude de alterações eletrofisiológicas corticais induzidas pela estimulação de vias sensoriais durante o desenvolvimento parece depender do status nutricional do animal (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000).

Tem sido convincentemente demonstrado que a estimulação ambiental no início da vida pode influenciar o desenvolvimento e as funções cerebrais (RENNER & ROSENZWEIG, 1987). Tais efeitos são ao menos em parte devido à ativação de várias



vias sensoriais durante a estimulação ambiental (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000). Pela mesma lógica, a aplicação da eletroestimulação periférica (**EP**), para ativar uma única via sensorial, pode também interferir no funcionamento do sistema nervoso central (FUJII *et al.*, 1996; FROC *et al.*, 2000) e ser benéfica no tratamento de várias doenças neurológicas (FRASER *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005). De fato, evidências recentes em humanos adultos revelaram que a **EP** modifica a excitabilidade cortical (KAELIN-LANG *et al.*, 2002) e aumenta a eficácia da reabilitação motora (POWELL *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 1999; CONFORTO *et al.*, 2002).

A estimulação elétrica com várias frequências aplicadas em certas partes do corpo pode ter efeitos específicos sobre o sistema nervoso central. Por exemplo, a **EP** com 2Hz produz um aumento significativo da liberação da encefalina, enquanto que a **EP** com 100 Hz aumenta a liberação de dinorfina na medula espinhal (FEI *et al.*, 1986; HAN & SUN, 1990; Han, 2003). Os mecanismos centrais envolvidos nesta codificação de frequências ainda não estão esclarecidos. Do ponto de vista eletrofisiológico, tais efeitos podem ser estudados por meio do fenômeno conhecido como “depressão alastrante da atividade elétrica cerebral” (**DA**), utilizado no presente trabalho, e que será descrito a seguir.

### **1.3 Depressão alastrante, desnutrição e eletroestimulação**

O desenvolvimento tecnológico no campo da eletrônica permitiu a construção de equipamentos que propiciam o registro e análise da atividade elétrica cerebral. Esse fato acrescentou um importante capítulo ao estudo do cérebro: a eletrofisiologia. A atividade elétrica neuronal é a principal característica fisiológica do tecido nervoso. Portanto, os métodos e as técnicas que permitem o registro e a análise dessa atividade

podem fornecer informações importantes para que se compreenda como esse órgão funciona, tanto sob condições normais, como patológicas (GUEDES, 2005).

Em nosso laboratório, pesquisa-se experimentalmente o funcionamento do sistema nervoso através de estudos eletrofisiológicos, em que se utiliza o fenômeno da depressão alastrante cortical (**DA**). A **DA** foi descrita pela primeira vez como uma “onda” propagável, de depressão da atividade elétrica cortical espontânea (LEÃO, 1944). O fenômeno consiste numa resposta local reversível do tecido cortical, provocada por estimulação elétrica, mecânica ou química. Essa onda de depressão propaga-se de forma concêntrica por todo o córtex (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min) e ao final de 10 a 15 min, o tecido cortical recupera-se. À medida que a **DA** se propaga para regiões cada vez mais afastadas, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir do ponto estimulado. Associada à depressão no EEG, é observada uma variação de voltagem contínua (DC), caracterizada por um curso temporal muito lento, na região cortical invadida pela **DA** (LEÃO, 1947; 1951).

Desde a primeira descrição da **DA**, inúmeras pesquisas têm sido feitas para esclarecer os processos responsáveis por este fenômeno. O envolvimento de alguns íons (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 1974; GUEDES & DO CARMO, 1980) e de sistemas de neurotransmissores (GUEDES *et al.*, 1987a; 1988; 1992; 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006) têm sido sugeridos.

A susceptibilidade cortical ao fenômeno da **DA** depende das condições em que se encontra o tecido cerebral, de modo que, em alguns casos, o córtex pode se tornar mais vulnerável ao fenômeno, a julgar pelas velocidades de propagação mais altas, e, em outros, se tornar mais resistentes, a julgar pelas velocidades mais baixas. Dentre as condições que dificultam a propagação da **DA** pode-se mencionar o envelhecimento

(GUEDES *et al.*, 1996), o uso de anestésicos (GUEDES & BARRETO, 1993), o hipotireoidismo (GUEDES & PEREIRA-DA-SILVA, 1993), dietas hiperlipídicas (MEDEIROS, 1996), a manipulação do sistema serotoninérgico através de dietas (VERÇOSA, 1997) e de drogas (TRINDADE-FILHO, 1995; ARAÚJO, 1997; CABRAL-FILHO *et al.*, 1995; GUEDES *et al.*, 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006). Por outro lado, a hipoglicemia (XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991), a privação de sono paradoxal (GUEDES, 1984), o tratamento com agonistas do ácido gama-amino-butírico (GUEDES *et al.*, 1992), a desnutrição (GUEDES, 1984) e dietas hipolipídicas (MEDEIROS, 1996) facilitam a velocidade de propagação deste fenômeno. Os efeitos facilitatórios da desnutrição no início da vida sobre a susceptibilidade cortical à **DA** têm sido determinados em diversos estudos experimentais (GUEDES, 1984; ANDRADE *et al.*, 1990; XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991; ROCHA-DE-MELO, 1994). No entanto, se a desnutrição é imposta apenas na idade adulta, não há alterações sobre a **DA** (GUEDES *et al.*, 1987b).

Com respeito aos efeitos da estimulação ambiental sobre a **DA**, Santos-Monteiro *et al.* (2000) demonstraram redução da velocidade de propagação desse fenômeno em ratos submetidos, durante o aleitamento, a episódios diários de estimulação multi-sensorial. É muito provável que tal efeito ocorra com a participação da ativação central (cerebral), por meio das vias sensoriais ativadas durante a estimulação multi-sensorial. Para esclarecer a participação da via somestésica nesse efeito, decidiu-se, no presente trabalho, avaliar as possíveis modificações da **DA** em ratos submetidos à **EP** durante o aleitamento. Adicionalmente, aliou-se, ao estudo eletrofisiológico, a investigação de alterações comportamentais na idade adulta, pelas razões abaixo descritas.

#### 1.4 Estimulação sensorial, desnutrição e comportamento

A função básica do sistema nervoso, do qual o cérebro é o componente mais importante, é gerar comportamento (GUEDES, 1985). No início da vida, inúmeras condições que afetam o sistema nervoso central podem alterar o comportamento dos indivíduos na idade adulta. Há diferenças, por exemplo, no desempenho dos animais normonutridos e de animais desnutridos, quando submetidos a condicionamento que visa a desenvolver comportamentos novos, como achar a saída de um labirinto para receber comida ou saltar para uma plataforma a fim de evitar um choque elétrico nas patas (TEODÓSIO *et al*, 1979). Certos tipos de estimulação ambiental administrada durante o período crítico do desenvolvimento neural podem permanentemente modificar o comportamento adulto (ESCORIHUELA *et al.*,1994). Estimulação sensorial durante o desenvolvimento pode também interferir em certos comportamentos de ratos adultos, como o comportamento exploratório (ROCHA & MELLO, 1994).

O termo "atividade exploratória" é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só as respostas reflexas imediatas de atenção, como também as respostas voluntárias típicas. Para o estudo experimental do comportamento exploratório, tem-se usado a exposição do a um ambiente nunca experimentado anteriormente. Para isso, usa-se um aparelho denominado "Campo Aberto"(em inglês: *open field*). O pressuposto básico envolvido nesse estudo de confinamento em um novo ambiente é que, no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória (NAHAS, 1999).

O teste do Campo Aberto foi originalmente descrito por Hall (1951) como uma arena circular para testar os efeitos de ambientes não familiares sobre a emocionalidade em animais. Esse teste baseia-se em parâmetros como: taxas de deambulação e de defecação do animal, frequência de comportamento de levantar-se, dentre outros, durante o seu desempenho no teste. No presente estudo o teste do Campo Aberto complementou o estudo eletroencefalográfico para avaliar os efeitos da **EP** sobre o desenvolvimento cerebral em animais desnutridos precocemente.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em nosso laboratório, evidências recentes mostraram que a propagação da **DA** encontra-se dificultada quando submetemos o animal, durante o desenvolvimento cerebral, a estímulos ambientais (SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000), sugerindo que a estimulação de vias sensoriais durante o desenvolvimento do sistema nervoso pode interferir com a susceptibilidade cortical à DA. Diante disso considerou-se relevante investigar tais efeitos da eletroestimulação periférica (**EP**) unilateral, sobre a atividade elétrica cerebral e sobre o comportamento exploratório, avaliados respectivamente pela susceptibilidade cortical ao fenômeno da **DA** e pelo aparelho de campo aberto. Esta investigação experimental pode subsidiar, de forma relevante, estudos de aplicações clínicas em fisioterapia, envolvendo a **EP** em países em desenvolvimento, onde a desnutrição infantil continua sendo um sério problema de saúde pública.

### 3. HIPÓTESES

- A ativação repetitiva de aferências cutâneas somato-sensoriais por meio da **EP**, durante o desenvolvimento, reduz a susceptibilidade cortical à depressão alastrante, como também altera o comportamento exploratório do animal.
- Estes efeitos são influenciados pelo estado nutricional no início da vida e se tornam permanentes, sendo detectáveis na vida adulta.
- A ação da **EP** sobre a **DA** e o comportamento são dependente da frequência empregada na estimulação.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Investigar, em ratos jovens (35-45 dias) ou adultos (95-105 dias), normonutridos ou desnutridos no início da vida, os efeitos da eletroestimulação periférica unilateral precoce sobre parâmetros ponderais, eletrofisiológicos cerebrais (**ECoG** e **DA**) e comportamentais (atividade exploratória).

### 4.2 Específicos

- Avaliar a evolução do peso corporal durante o desenvolvimento, em função do estado nutricional e da condição de **EP**;
- Analisar os efeitos agudos (aos 35-45 dias) e duradouros (aos 95 e 105 dias) da desnutrição e da **EP** unilateral precoce em ratos sobre a susceptibilidade cortical ao fenômeno da depressão alastrante;
- Analisar e comparar os efeitos de duas frequências (de 2 Hz e 60 Hz) de **EP** sobre as características eletrofisiológicas da **DA**;
- Comparar os parâmetros acima, nos dois hemisfério cerebrais, para verificar se a eletroestimulação periférica aplicada unilateralmente está associada a efeitos assimétricos cerebrais;
- Avaliar, em ratos adultos (entre 85 e 95 dias de vida), normais ou previamente desnutridos (no aleitamento), os efeitos da eletroestimulação periférica unilateral sobre o desenvolvimento das respostas exploratórias, através do estudo comportamental no teste do Campo Aberto.



- Verificar se o peso úmido e seco dos hemisférios cerebrais (direito e esquerdo) e do cerebelo foram alterados pela aplicação precoce da eletroestimulação periférica unilateral.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 200 ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esses animais foram mantidos sob condições padrão do biotério, em sala à temperatura de  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ , submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o escuro iniciando-se às dezoito horas), com livre acesso à água e comida.

Os ratos neonatos foram aleatoriamente distribuídos, vinte e quatro horas após o parto, em ninhadas de seis filhotes por mãe. Em seguida, os animais foram agrupados de acordo com a descrição abaixo.

Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram submetidos à apreciação da comissão de ética em experimentação animal da UFPE, e foram por ela aprovados.

### 5.2 Grupos experimentais

#### 5.2.1 Condição Nutricional

Os animais foram, divididos em dois grupos, segundo a dieta materna:

1. **Grupo N** (n=110)- Ratos amamentados por mães que foram alimentadas com a dieta de manutenção do biotério (**DMB** - LABINA, "Purina do Brasil", considerada dieta **controle**, contendo 23% de proteína de origem mista, animal e vegetal; Tabela 1), desde a gestação das mães até o dia do registro eletrofisiológico.

2. **Grupo D** (n=90)- Ratos desnutridos, aleitados por nutrizes que, durante a lactação, receberam a “Dieta Básica Regional” – **DBR** (Tabela 2), com aproximadamente 8 % de proteína (TEODÓSIO *et al.*, 1990). Após o desmame, os filhotes foram mantidos com **DMB** até o término do experimento. O modelo experimental de desnutrição pelo uso da **DBR** foi desenvolvido para reproduzir, em laboratórios, um tipo de desnutrição similar ao que foi descrito em humanos (TEODÓSIO *et al.*, 1990). A **DBR** é uma dieta experimental feita com alimentos que constituíam a base da refeição de algumas comunidades rurais economicamente desfavorecidas no nordeste brasileiro (Zona da Mata, do estado de Pernambuco). Esses alimentos foram determinados por um inquérito nutricional desenvolvido pelo Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (BATISTA-FILHO *et al.*, 1968). A partir desses inquéritos foram identificados os quatros alimentos básicos mais freqüentemente consumidos (feijão mulatinho = *Phaseolus vulgaris*, farinha de mandioca = *Manioc esculenta*, batata doce = *Ipomaea batatas* e carne de charque = carne bovina salgada e prensada). A **DBR** é rica em carboidratos e fibras, mas pobre em vitaminas, minerais, gorduras e proteínas, as quais são predominantemente de origem vegetal. Apesar de simular a desnutrição humana da área estudada na década de 70, ela ainda reproduz, neste aspecto, dietas comuns em populações de vários países em desenvolvimento (MCLAREN & PELLETT, 1970; RAMOS-ALIAGA, 1978). Estudos experimentais comprovaram que a **DBR** pode levar a alterações significativas em parâmetros fisiológicos, bioquímicos, metabólicos do sistema nervoso, similares aos vistos em humanos desnutridos (GUEDES, 1984; GUEDES *et al.*, 1987b; SILVA *et al.*, 1987; TEODÓSIO *et al.*, 1990; ANDRADE *et al.*, 1990; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997; PIKANÇO-DINIZ *et al.*, 1998; COSTA-CRUZ & GUEDES, 2001; GUEDES *et al.*, 2002).

Cada um dos dois grupos acima, nutricionalmente distintos, foi subdividido em 3 subgrupos: 2 submetidos à eletroestimulação periférica precoce (grupo **EP**) e 1 controle para essa estimulação (grupo **EP- "sham"**; vide descrição adiante).

**TABELA 1** – Composição da dieta de manutenção do biotério "Labina" (Purina do Brasil Ltda)\*

Composição Básica: Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz Cru, Carbonato de Cálcio, Fosfato Bicálcico, Sal, Pré-Mix.

### ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO

Vitamina A	<b>20.000 UI</b>
Vitamina D <sub>3</sub>	<b>6.000</b>
Vitamina E	<b>30 UI</b>
Vitamina K	<b>6 mg</b>
Vitamina B <sub>12</sub>	<b>10mg</b>
Vitamina B <sub>2</sub>	<b>28 mg</b>
Pantotenato de Cálcio	<b>24 mg</b>
Niacina	<b>95 mg</b>
Tiamina	<b>4 mg</b>
Colina	<b>2.000 mg</b>
Pirodoxina	<b>6 mg</b>
Biotina	<b>0,1 mg</b>
Ácido Fólico	<b>0,5 mg</b>
Manganês	<b>50 mg</b>
Iodo	<b>2 mg</b>
Ferro	<b>65 mg</b>
Zinco	<b>35 mg</b>
Cobre	<b>26 mg</b>
Antioxidante	<b>100 mg</b>

### NÍVEIS DE GARANTIA

Unidade (máx.)	<b>13,0%</b>
Proteína (mín.)	<b>23,0%</b>
Extrato Etéreo (mín.)	<b>2,5%</b>
Matéria Fibrosa (máx.)	<b>9,0%</b>
Matéria mineral (máx.)	<b>8,0%</b>
Cálcio (Ca) (máx.)	<b>1,8%</b>
Fósforo (P)	<b>0,8%</b>

\*Segundo Purina do Brasil Ltda.

**TABELA 2-** Composição centesimal da “Dieta Básica Regional” (DBR), segundo TEODÓSIO *et al.*,(1990), usada nos grupos desnutridos. **PTN:** Proteína; **HC:** Carboidratos; **L:** Lipídios; **C:** Cinzas; **F:** Fibras

<i>Ingredientes</i>	<i>g %</i>	<i>Composição (g%)</i>					<i>Kcal %</i>
		<i>PTN</i>	<i>HC</i>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>F</i>	
Feijão Mulatinho <sup>a</sup> ( <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 <sup>a</sup>	3,74	2,74	-	0,06	0,06	-	11,50
Gordura da Charque	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata Doce <sup>a</sup> ( <i>Ipomaea batatas</i> )	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>	<b>7,87</b>	<b>69,24</b>	<b>0,80</b>	<b>1,26</b>	<b>7,21</b>	<b>315,64</b>

a= Cozido, seco e moído

### 5.2.2 Eletroestimulação Periférica

A eletroestimulação periférica unilateral iniciou-se ao 7º dia de vida e constituiu-se de sessões diárias (entre 11:00hs e 14:00hs) durante um período de 3 semanas, com duração de 15 minutos na 1ª semana, 20 minutos na 2ª e de 30 minutos na 3ª semana. Para essa eletroestimulação, foram fixados unilateralmente dois eletrodos pequenos de folha de alumínio (de uso culinário), em forma de anel, com 5 mm de largura, circundando a superfície dos membros esquerdos (anterior e posterior) dos filhotes. No local de colocação dos eletrodos, pele foi previamente umedecida com um gel condutor. Em seguida, os animais foram envoltos em uma faixa plástica, de modo a dificultar sua mobilização. O conjunto foi suspenso e fixado a uma haste metálica, impedindo o contato dos membros do animal com o solo e o seu deslocamento (Figura 1). O eletrodo de polaridade negativa foi sempre colocado na pata anterior do animal. Os eletrodos conectados a um eletroestimulador modelo S88 (Grass Medical Instruments) permitiram que os animais fossem submetidos a eletroestimulação, com pulsos de onda quadrada, utilizando os seguintes parâmetros:

1. **Grupo EP-2**(n=65, sendo 36 N e 29 D)- Frequência de 2Hz, intensidade entre 10-40V\* e duração de pulso de 1,5ms;
2. **Grupo EP-60** (n=69, sendo 37 N e 32 D)- Frequência de 60Hz, intensidade entre 10-40V\* e duração do pulso de 1,5ms;
3. **Grupo EP-“sham”** (estimulação fictícia; n=66, sendo 37 N e 29 D)- Submetidos aos procedimentos de contenção e fixação dos eletrodos, pelo mesmo tempo dos dois outros grupos, mas sem estimulação.

\* grandezas estabelecidas pelo pesquisador; a intensidade foi definida como aquela maior voltagem do estímulo em que o animal não apresentava vocalização, sugestiva de sensação dolorosa. As voltagens médias ( $\pm$  desvio padrão, em V), em cada grupo, nas 3 semanas, foram os seguintes: **N60**- 1ª. semana, 20

$\pm 8,92$ ; 2ª. semana,  $20 \pm 5,86$ ; 3ª. semana,  $17 \pm 6,47$ ; **N2**- 1ª. semana,  $20 \pm 5,48$ ; 2ª. semana,  $19 \pm 4,94$ ; 3ª. semana,  $18 \pm 5,75$ ; **D60**- 1ª. semana,  $18 \pm 5,15$ , 2ª. semana,  $20 \pm 5,20$ ; 3ª. semana,  $17 \pm 5,66$ ; **D2**- 1ª. semana,  $22 \pm 6,29$ ; 2ª. semana,  $24 \pm 5,78$ ; 3ª. semana,  $20 \pm 7,19$ .

Todos os grupos experimentais estão descritos na figura 2.

### 5.3 Análise comportamental

A análise comportamental foi realizada aos 85-95 dias de idade, isto é, aproximadamente 10 dias antes dos registros eletrofisiológicos, nos mesmos animais. Para isso, foi empregado um aparelho de campo aberto, utilizado para observar a atividade exploratória em roedores. Cada animal foi colocado, sozinho, no centro de uma arena circular com um piso de madeira (85 cm de diâmetro x 51,5 cm de altura), dividida por três círculos concêntricos separados por 17 cm. Esses círculos delimitaram 3 anéis: um central, um intermediário e um distal. O anel central, com 17 cm de diâmetro, não tinha subdivisões. O anel intermediário foi subdividido em 6 setores iguais, obtidos pelo desenho de 6 segmentos de reta que formavam ângulos de 60° em relação ao centro da área circular. O anel distal, pela mesma metodologia, foi subdividido em 12 setores iguais (pelo desenho de 12 segmentos de reta que formavam ângulos de 30° em relação ao centro da área circular; Figura 3). Nesse aparelho, foi observada, em uma única sessão (entre 11:00hs e 14:00hs), a atividade exploratória de cada animal durante 300 segundos (um animal de cada vez). Durante a observação, as condições ambientais foram controladas: iluminação tênue (luz infravermelha), ruídos externos minimizados e  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura ambiente. Para reduzir as influências de um animal sobre o comportamento do próximo a ser testado, o aparelho foi cuidadosamente limpo com álcool diluído, para eliminar as informações olfatórias de territorialidade representadas pela urina e fezes do rato anteriormente observado.

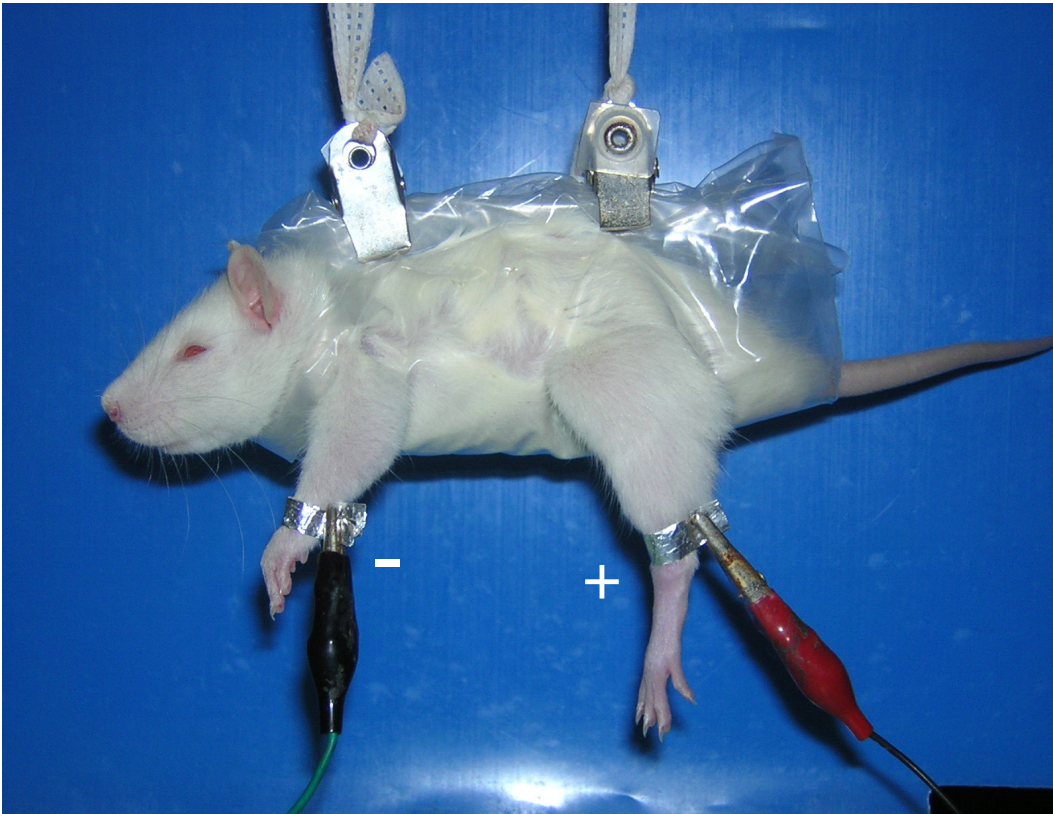


O teste consistiu na mensuração, durante 300 segundos, dos seguintes comportamentos:

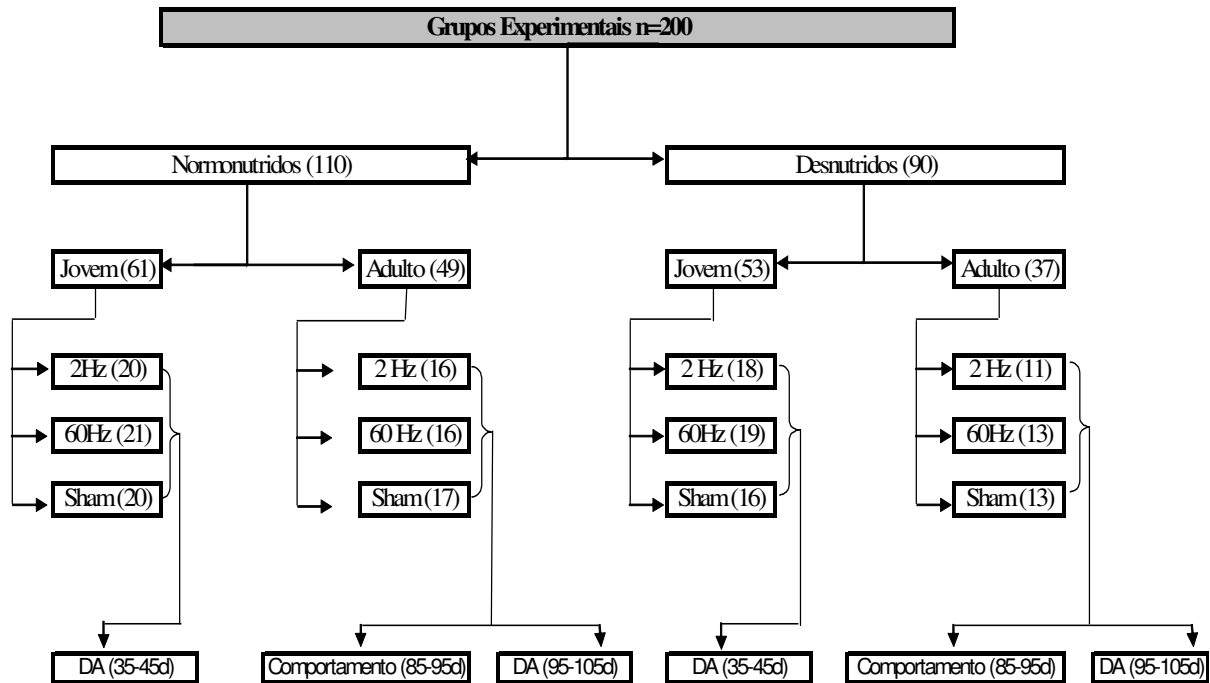
- A distância percorrida;
- A frequência do comportamento de levantar-se (*rearing*);
- O número de vezes que o animal deslocava-se atingindo o centro do campo;
- O número de bolos fecais.

A distância percorrida foi aferida a partir da anotação do número de setores, desenhados no piso do aparelho, que foram transpostos pelos animais. Essa quantificação de deslocamento do animal é um indicador da sua atividade exploratória.

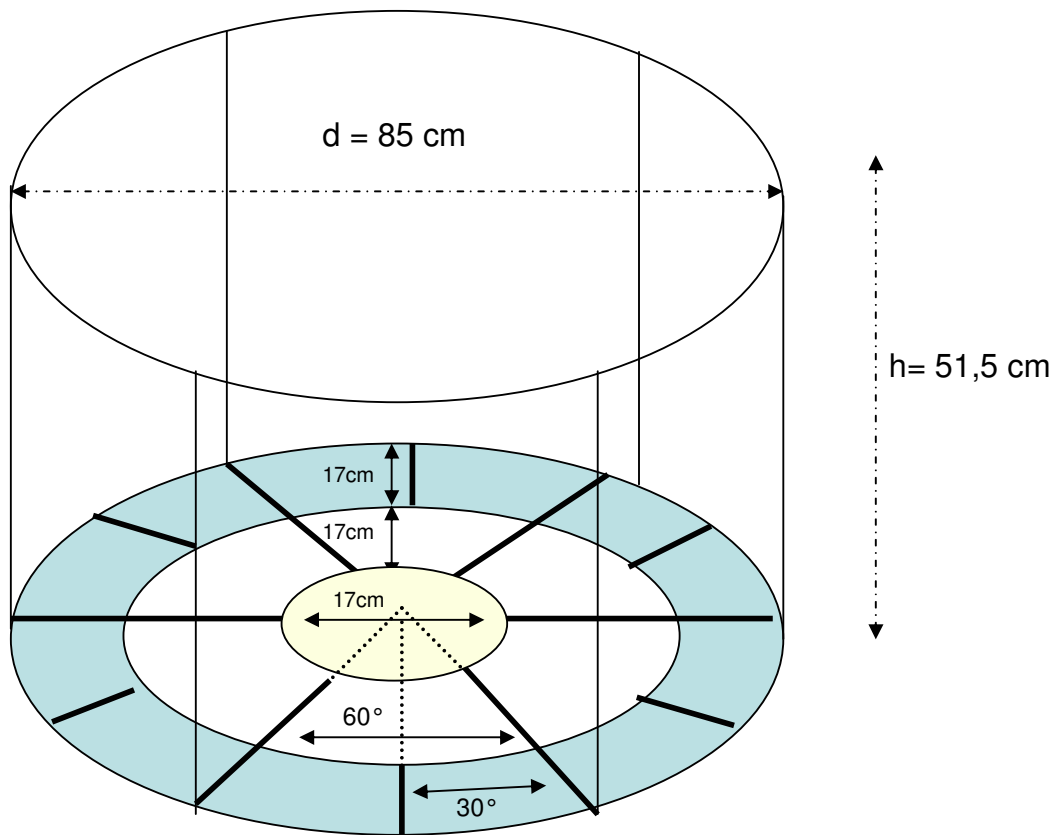
A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) frequentemente se correlaciona com outras atividades como auto-limpeza corporal, reações de defesa e sexuais e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade (BIRKE & ARCHER, 1983). Conforme o animal explore mais as regiões periféricas ou centrais do aparelho, é possível inferir um maior ou menor nível de medo ou ansiedade, respectivamente. As reações do sistema nervoso neurovegetativo foram avaliadas pela taxa de defecação obtida através da contagem do número de bolos fecais que o animal elimina em uma sessão de teste.



**FIGURA 1-** Foto ilustrando a técnica de contenção do animal, bem como a posição dos dois eletrodos estimuladores, aplicados nas patas esquerdas (um em cada pata). O eletrodo de polaridade negativa foi sempre colocado na pata anterior do animal. As sessões diárias de estimulação elétrica repetitiva foram realizadas entre o 7<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia de vida pós-natal (detalhes em métodos).



**FIGURA 2-** Esquema demonstrativo dos grupos experimentais. Ratos jovens (35-45 dias de vida) e adultos (85-105 dias), **normotricos** (amamentados por nutrizes alimentadas com a dieta de manutenção do biotério, com 23% de proteína desde a gestação) e **desnutridos** (amamentados por mães que receberam a dieta básica regional -DBR, com 8% de proteína, da gestação até o desmame -21 dias). “**Sham**” - não estimulado; grupos eletroestimulados com frequência de **60Hz** e **2Hz**. Os números entre parênteses indicam a quantidade de animais em cada grupo.



**FIGURA 3-** Desenho esquemático do aparelho de campo aberto utilizado para observar a atividade exploratória em roedores. Cada animal foi colocado no centro da arena circular com uma superfície de madeira (85 cm de diâmetro x 51,5 cm de altura), dividida por três círculos concêntricos separados por 17 cm. Esses círculos delimitaram 3 anéis: um central, um intermediário e um distal. O anel central, com 17 cm de diâmetro, não tinha subdivisões. O anel intermediário foi subdividido em 6 setores iguais, obtidos pelo desenho de 6 segmentos de reta que formavam ângulos de  $60^\circ$  em relação ao centro da área circular. O anel distal, pela mesma metodologia, foi subdividido em 12 setores iguais (pelo desenho de 12 segmentos de reta que formavam ângulos de  $30^\circ$  em relação ao centro da área circular). Durante o procedimento, as condições ambientais foram controladas: iluminação tênue (luz infravermelha), ruídos externos minimizados e  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura ambiente. O teste consistiu na mensuração, durante 300 segundos, dos seguintes comportamentos: Deambulação, levantar, cruzar o centro do campo e o número de bolos fecais eliminados pelo animal.

#### 5.4 Registro eletrofisiológico da depressão alastrante

Cada animal dos diferentes grupos experimentais, aos 35-45 (grupo jovem) e aos 95-105 (grupo adulto) dias de idade, foi anestesiado com 1 mL/kg de peso corporal, de uma solução de uretana a 10% + cloralose a 0,4% (dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose), via intra-peritoneal. O animal respirou espontaneamente e foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável. Este aparelho permitiu a manutenção da temperatura retal do rato em  $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 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, sendo 3 em cada lado do crânio (anterior, médio e posterior, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada), alinhados paralelamente à linha média.

Os registros eletrofisiológicos foram feitos com eletrodos do tipo "Ag-AgCl", conectados a um polígrafo modelo 7D (Grass Medical Instruments). Os eletrodos eram confeccionados no próprio laboratório (Bezerra *et al.*, 2005). Para isso, fios de prata de 3 cm foram limpos e imersos em uma solução de Ringer com a finalidade de promover, por meio de eletrólise, a deposição de uma fina camada de AgCl nesses fios. Em seguida, eles foram colocados em tubos cônicos de polietileno com 5 cm de comprimento, 5 mm de diâmetro superior e 0,5 mm de diâmetro interno na extremidade inferior. Esses tubos foram preenchidos com uma solução de Agar-Ringer a 1,5%. Dois eletrodos assim preparados, foram colados com cola à base de cianoacrilato, de modo a formarem um par, com distância fixa entre as pontas (variando, de um par a outro, entre 3 e 5,5mm). Esse par era preso em uma haste de madeira, e esta a um sistema de alavancas que permitia a movimentação dos eletrodos para cima e para baixo por meio

do acionamento de um parafuso. Estes dois eletrodos foram posicionados sob a superfície cortical exposta dos orifícios de registro. Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado sobre os ossos nasais e serviu de referência comum ("eletrodo de referência") aos dois eletrodos registradores. Esses registros foram realizados com um par de eletrodos "registradores" em 2 pontos de cada um dos hemisférios cerebrais na área fronto-parietal. O registro foi feito por um período mínimo de quatro horas, sendo duas horas em cada hemisfério. Em metade dos animais de cada grupo, as primeiras duas horas do registro foram no hemisfério direito (contralateral) e na outra metade, no esquerdo (ipsilateral).

Através dos eletrodos registradores foram detectadas e registradas, simultaneamente, a atividade elétrica cortical (**ECoG**) e a variação lenta de voltagem (**VLV**) que acompanha a **DA**.

A **DA** 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%, colocada durante 1 minuto sobre um ponto da superfície cortical ao nível do orifício de estimulação, na região parietal posterior. A velocidade de propagação da **DA** foi calculada com base na distância entre os eletrodos registradores e no tempo gasto pela **DA** para percorrer esta distância. Para cada uma das horas de registro foram calculadas as velocidades médias de propagação do fenômeno. O mesmo procedimento foi realizado no outro hemisfério cerebral, para comparação.

## **5.5 Determinações ponderais**

### **5.5.1 Pesos Corporais**

O peso corporal foi obtido aos 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias de vida, e no dia do registro. Os filhotes foram pesados em balança eletrônica (Marte, Mod. 54.000, com sensibilidade até 0,1g).

### **5.5.2 Pesos Encefálicos**

No final das sessões de registro da **DA**, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por uma lesão produzida pela introdução de estilete metálico na região bulbar, com subsequente parada cardio-respiratória. Com a cabeça fixada à base do aparelho estereotáxico, foi feita a craniectomia, com a exposição de ambos os hemisférios cerebrais. Estes foram separados realizando-se secção do corpo caloso, por meio de incisão na linha média da cabeça. Esta incisão foi feita posicionando-se uma lâmina (fixada à haste que prende eletrodos do aparelho estereotáxico) de modo que, ao se deslocar no sentido postero-anterior, seccionou o corpo caloso. Assim, foram separados os hemisférios cerebrais da maneira mais uniforme, efetuando-se o corte inter-hemisférico exatamente na linha média, deslocando-se a lâmina com o auxílio do sistema de coordenadas estereotáxicas.

Os hemisférios direito e esquerdo e o cerebelo foram imediatamente removidos e pesados separadamente (peso úmido), depois foram mantidos a 100° C e pesados em intervalos de 1-2 dias até atingirem um peso constante (peso seco).

## 5.6 Análise estatística

Para a análise dos pesos corporais, cerebrais e das velocidades da **DA** foi usada a análise de variância “**ANOVA**” seguida de um teste “post-hoc” (Tukey), quando necessário. Para comparação intra-grupo, entre os dois hemisférios cerebrais dos mesmos animais foi utilizado o teste “t” pareado. Para análise dos dados comportamentais foi usado o teste U de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as diferenças em que  $p \leq 0,05$ .



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Pesos corporais e encefálicos

Nos animais desnutridos durante a lactação pela **DBR** (Grupos **D**), os pesos corporais foram significativamente menores, quando comparados aos dos animais **N**, em todas as idades, exceto aos 90 dias. Em ambas as condições nutricionais, os grupos submetidos à **EP** apresentaram pesos comparáveis aos dos respectivos grupos controle (“**sham**”). Esses resultados estão mostrados na Tabela 3.

Os pesos úmido e seco do cerebelo, bem como os dos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, nos grupos desnutridos, foram menores que aqueles dos grupos nutridos correspondentes, tanto em ratos jovens (35-45 dias de vida) quanto nos adultos (95-105 dias). Em ambas as condições nutricionais, os pesos encefálicos dos grupos submetidos à **EP** foram comparáveis aos dos respectivos grupos controle (“**sham**”).

Nenhuma diferença foi observada, com relação aos pesos úmidos e secos, entre o hemisfério esquerdo, homolateral à **EP**, e o hemisfério direito do mesmo animal.

Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

### 6.2 Velocidade de propagação da depressão alastrante

Em todos os grupos, a aplicação tópica de KCl a 2% por 1 minuto deflagrou uma única onda de **DA**, que se propagou normalmente e foi registrada pelos dois eletrodos localizados mais anteriormente no hemisfério estimulado. As figuras 4 e 5 mostram registros eletrofisiológicos representativos, em ambas as condições nutricionais, aos 35-

45 dias (Grupos Jovens; Figura 4) e aos 95-105 dias (Grupos Adultos; Figura 5), submetidos previamente (do 7º ao 28º dia de vida) à **EP**.

A **EP** com 2 Hz, mas não com 60 Hz, reduziu, nos animais **N**, as velocidades da **DA** no hemisfério contralateral às patas estimuladas, em comparação aos correspondentes grupos não estimulados (“**sham**”). Esse efeito não foi observado no hemisfério ipsilateral à **EP**, no qual as velocidades da **DA** foram comparáveis às dos respectivos grupos “**sham**” (Figura 6).

Na condição de deficiência nutricional precoce (grupos **D**), as velocidades da **DA** no grupo não estimulado (“**sham**”) foram maiores do que as do grupo **N** correspondente, confirmando o efeito facilitador da desnutrição sobre a **DA**, descrito anteriormente (GUEDES, 1984; GUEDES *et al.*, 1987b; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997; SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000). Em comparação com o grupo “**sham**”, a **EP**, tanto na frequência de 2 Hz, quanto na de 60 Hz, reduziu as velocidades da **DA** no hemisfério contralateral dos ratos desnutridos, em ambas as idades testadas. Nos desnutridos jovens, essa redução foi maior do que aquela encontrada nos animais normonutridos, tornando assim as velocidades dos grupos **D-2** e **D-60** comparáveis às dos correspondentes grupos **N** (**N-2** e **N-60**). Nos desnutridos adultos, esse efeito só foi observado para a frequência de 60 Hz. Nenhum desses efeitos foi observado no hemisfério ipsilateral à **EP** (Tabela 5).

### 6.3 Análise comportamental

Nos animais normonutridos (Grupo **N**), as atividades exploratórias analisadas pela distância percorrida, frequência do comportamento de levantar-se (*rearing*) e pelo número de vezes que o animal deslocava-se atingindo o centro do campo foram mais altas nos animais estimulados com frequência de 2Hz, em comparação aos não

estimulados (“**sham**”). Nenhum desses efeitos foi observado no grupo 60Hz. O número de bolos fecais não diferiu entre os grupos analisados.

Quando avaliados os grupos desnutridos, nenhuma alteração, associada à **EP**, foi encontrada nas atividades exploratórias (Figura 7).

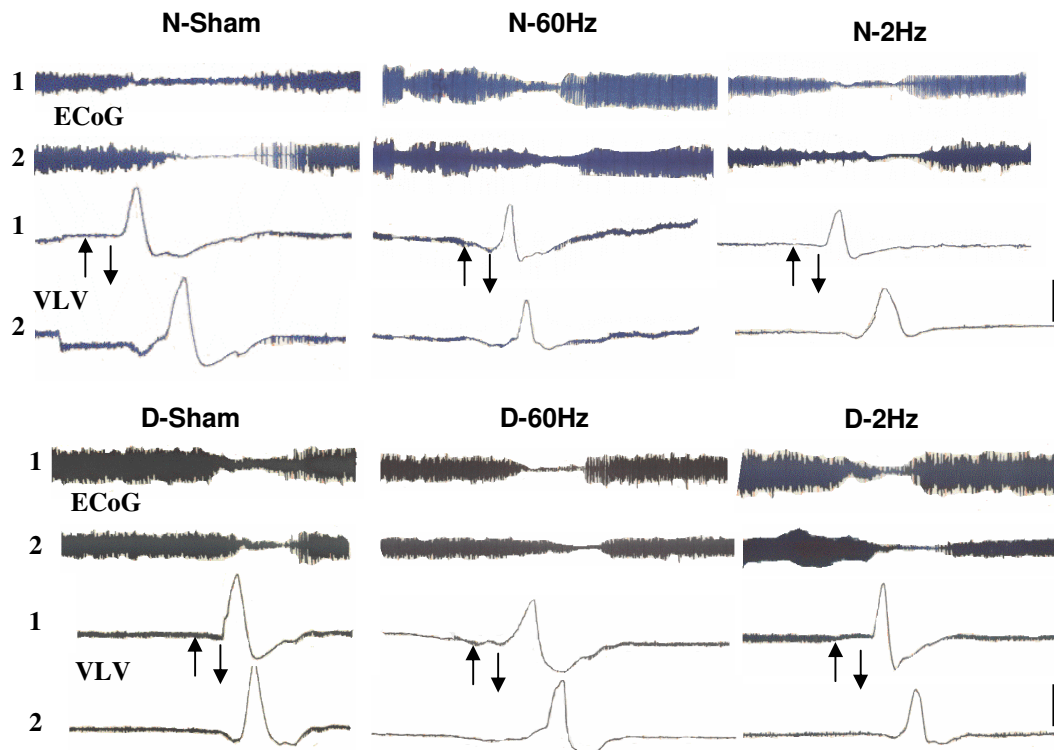
**TABELA 3-** Pesos corporais (g) de ratos normonutridos e desnutridos (**Grupos N e D**, respectivamente), amamentados por mães que receberam, desde a gestação até o desmame, a dieta de manutenção do biotério (**DMB**), com 23% de proteína, ou a dieta básica regional **-DBR**, com 8% de proteína. Após o desmame, todos receberam a DMB. “**Sham**” - não estimulado (controle); **60** e **2**, grupos estimulados com frequência de 60Hz e 2Hz, respectivamente. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ), dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra na coluna da esquerda. (ANOVA e teste de Tukey)

PESO CORPORAL (g)						
Grupo \ Idade	Idade					
	7° Dia	14° Dia	21° Dia	28° Dia	60° Dia	90° Dia
<b>N-Sham (a)</b>	17,4 $\pm$ 4,1 (33)	32,7 $\pm$ 5,6 (31)	47,6 $\pm$ 6,3 (35)	72,8 $\pm$ 9,7 (30)	211,3 $\pm$ 47,5 (11)	250,4 $\pm$ 53,9 (11)
<b>N-60 (b)</b>	17,7 $\pm$ 3,8 (37)	33,4 $\pm$ 5,2 (34)	48,9 $\pm$ 5,43 (35)	73,7 $\pm$ 11,2 (30)	214,4 $\pm$ 52,5 (13)	267,2 $\pm$ 60,9 (13)
<b>N-2 (c)</b>	17,7 $\pm$ 3,0 (28)	32,4 $\pm$ 2,7 (24)	48,3 $\pm$ 5,0 (32)	71,9 $\pm$ 7,2 (32)	180,1 $\pm$ 38,5 (14)	232,5 $\pm$ 49,5 (14)
<b>D-Sham (d)</b>	12,7 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup> (29)	15,2 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup> (30)	18,6 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup> (28)	36,5 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup> (30)	148,9 $\pm$ 21,9 <sup>a</sup> (10)	208,6 $\pm$ 49,2 (10)
<b>D-60 (e)</b>	11,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup> (27)	14,9 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup> (29)	17,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup> (27)	34,7 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup> (29)	153,8 $\pm$ 26,8 <sup>b</sup> (13)	215,8 $\pm$ 28,3 (13)
<b>D-2 (f)</b>	12,0 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup> (28)	15,0 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup> (27)	17,8 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup> (26)	36,6 $\pm$ 6,7 <sup>c</sup> (23)	123,0 $\pm$ 39,8 <sup>c</sup> (11)	199,1 $\pm$ 42,0 (10)

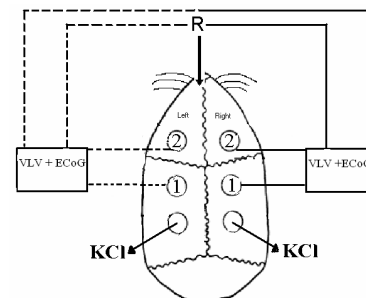
**TABELA 4-** Pesos encefálicos médios (cerebelo, hemisfério direito e esquerdo) úmidos e secos de ratos jovens (35-45 dias de vida) e adultos (95-105 dias), normonutridos e desnutridos (**Grupos N e D**, respectivamente), amamentados por mães que receberam, desde a gestação até o desmame, a dieta de manutenção do biotério [DMB], com 23% de proteína, ou a dieta básica regional -DBR, com 8% de proteína. Após o desmame, todos receberam a DMB. “Sham” - não estimulado (controle); **60** e **2**, grupos estimulados com frequência de 60Hz e 2Hz, respectivamente. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ), dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra na coluna da esquerda. (ANOVA e teste de Tukey)

	PESO ENCEFÁLICO (g)					
	PESO ÚMIDO			PESO SECO		
	H. Direito	H. Esquerdo	Cerebelo	H. Direito	H. Esquerdo	Cerebelo
<b>GRUPOS JOVENS</b>						
<b>N-Sham (a)</b>	0,555 $\pm$ 0,038 (10)	0,553 $\pm$ 0,040 (10)	0,226 $\pm$ 0,040 (10)	0,112 $\pm$ 0,009 (10)	0,112 $\pm$ 0,010 (10)	0,049 $\pm$ 0,010 (9)
<b>N-60 (b)</b>	0,556 $\pm$ 0,040 (10)	0,554 $\pm$ 0,049 (10)	0,222 $\pm$ 0,038 (10)	0,111 $\pm$ 0,008 (10)	0,110 $\pm$ 0,009 (10)	0,045 $\pm$ 0,006 (9)
<b>N-2 (c)</b>	0,563 $\pm$ 0,033 (10)	0,548 $\pm$ 0,041 (10)	0,219 $\pm$ 0,028 (10)	0,112 $\pm$ 0,008 (10)	0,109 $\pm$ 0,008 (10)	0,045 $\pm$ 0,007 (9)
<b>D-Sham(d)</b>	0,469 $\pm$ 0,025 <sup>a</sup> (10)	0,477 $\pm$ 0,077 <sup>a</sup> (10)	0,173 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup> (10)	0,096 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup> (10)	0,093 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup> (10)	0,037 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup> (9)
<b>D-60 (e)</b>	0,487 $\pm$ 0,031 <sup>b</sup> (10)	0,462 $\pm$ 0,040 <sup>b</sup> (10)	0,175 $\pm$ 0,041 <sup>b</sup> (10)	0,098 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup> (10)	0,093 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup> (10)	0,034 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup> (9)
<b>D-2 (f)</b>	0,492 $\pm$ 0,043 <sup>c</sup> (12)	0,484 $\pm$ 0,036 <sup>c</sup> (12)	0,168 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup> (12)	0,096 $\pm$ 0,025 <sup>c</sup> (10)	0,097 $\pm$ 0,010 <sup>c</sup> (10)	0,031 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup> (9)
<b>GRUPOS ADULTOS</b>						
<b>N-Sham (a)</b>	0,609 $\pm$ 0,053 (11)	0,633 $\pm$ 0,045 (11)	0,271 $\pm$ 0,011 (10)	0,128 $\pm$ 0,014 (4)	0,128 $\pm$ 0,016 (4)	0,045 $\pm$ 0,006 (5)
<b>N-60 (b)</b>	0,645 $\pm$ 0,044 (7)	0,634 $\pm$ 0,044 (7)	0,259 $\pm$ 0,067 (5)	0,141 $\pm$ 0,012 (4)	0,136 $\pm$ 0,012 (4)	0,052 $\pm$ 0,005 (5)
<b>N-2 (c)</b>	0,633 $\pm$ 0,049 (10)	0,624 $\pm$ 0,044 (10)	0,287 $\pm$ 0,043 (6)			
<b>D-Sham (d)</b>	0,547 $\pm$ 0,030 <sup>a</sup> (12)	0,541 $\pm$ 0,047 <sup>a</sup> (13)	0,207 $\pm$ 0,022 <sup>a</sup> (11)	0,110 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup> (4)	0,103 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup> (4)	0,028 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup> (5)
<b>D-60 (e)</b>	0,554 $\pm$ 0,039 <sup>b</sup> (10)	0,558 $\pm$ 0,044 <sup>b</sup> (10)	0,200 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup> (4)	0,109 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup> (4)	0,110 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup> (4)	0,037 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup> (5)
<b>D-2 (f)</b>	0,530 $\pm$ 0,069 <sup>c</sup> (6)	0,536 $\pm$ 0,062 <sup>c</sup> (6)	0,205 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup> (6)	0,108 $\pm$ 0,008 (3)	0,114 $\pm$ 0,008 (3)	0,036 $\pm$ 0,006 (3)

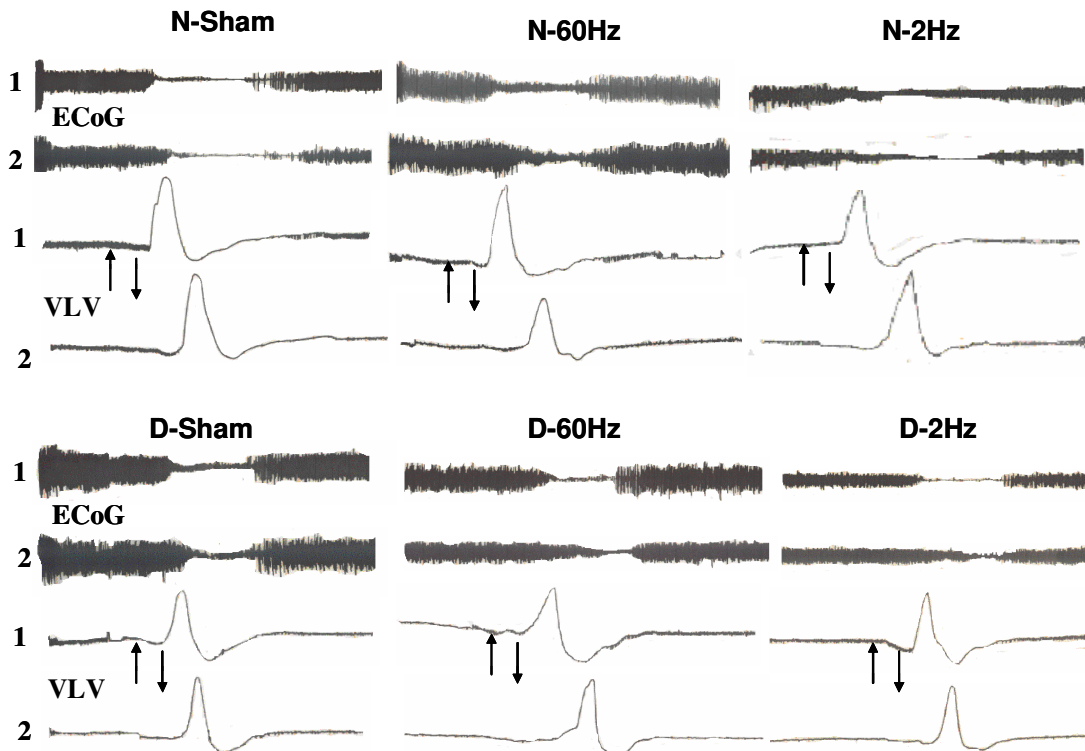
### RATOS JOVENS (35-45 DIAS)



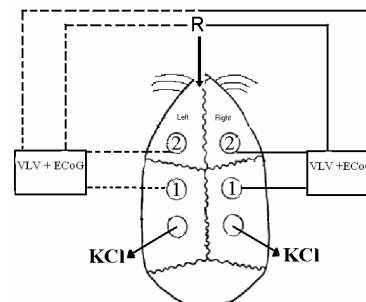
**FIGURA 4-** Registros da variação lenta de voltagem (VLV) e da atividade elétrica espontânea (ECoG) no córtex fronto-parietal do hemisfério contralateral à EP de seis ratos jovens (35-45 dias de vida), sendo 3 normotróficos e 3 desnutridos (**Grupos N e D**, respectivamente), amamentados por mães que receberam, desde a gestação até o desmame, a dieta de manutenção do biotério [DMB], com 23% de proteína, ou a dieta básica regional -DBR, com 8% de proteína. Após o desmame, todos receberam a DMB. Dos 7 aos 28 dias de vida, foram submetidos a eletroestimulação periférica com frequências de 2Hz ou 60 Hz (**N-2**, **N-60**, **D-2** e **D-60** respectivamente). “Sham”, grupos não estimulados. O desenho à direita mostra a posição dos eletrodos registradores 1 e 2 e a posição do eletrodo de referência (R), sobre os ossos nasais. A DA foi deflagrada aplicando-se KCl a 2% no orifício parietal posterior, no tempo indicado pelas setas (1 minuto). A barra de calibração vertical indica 10mV para a VLV e 1mV para ECoG.

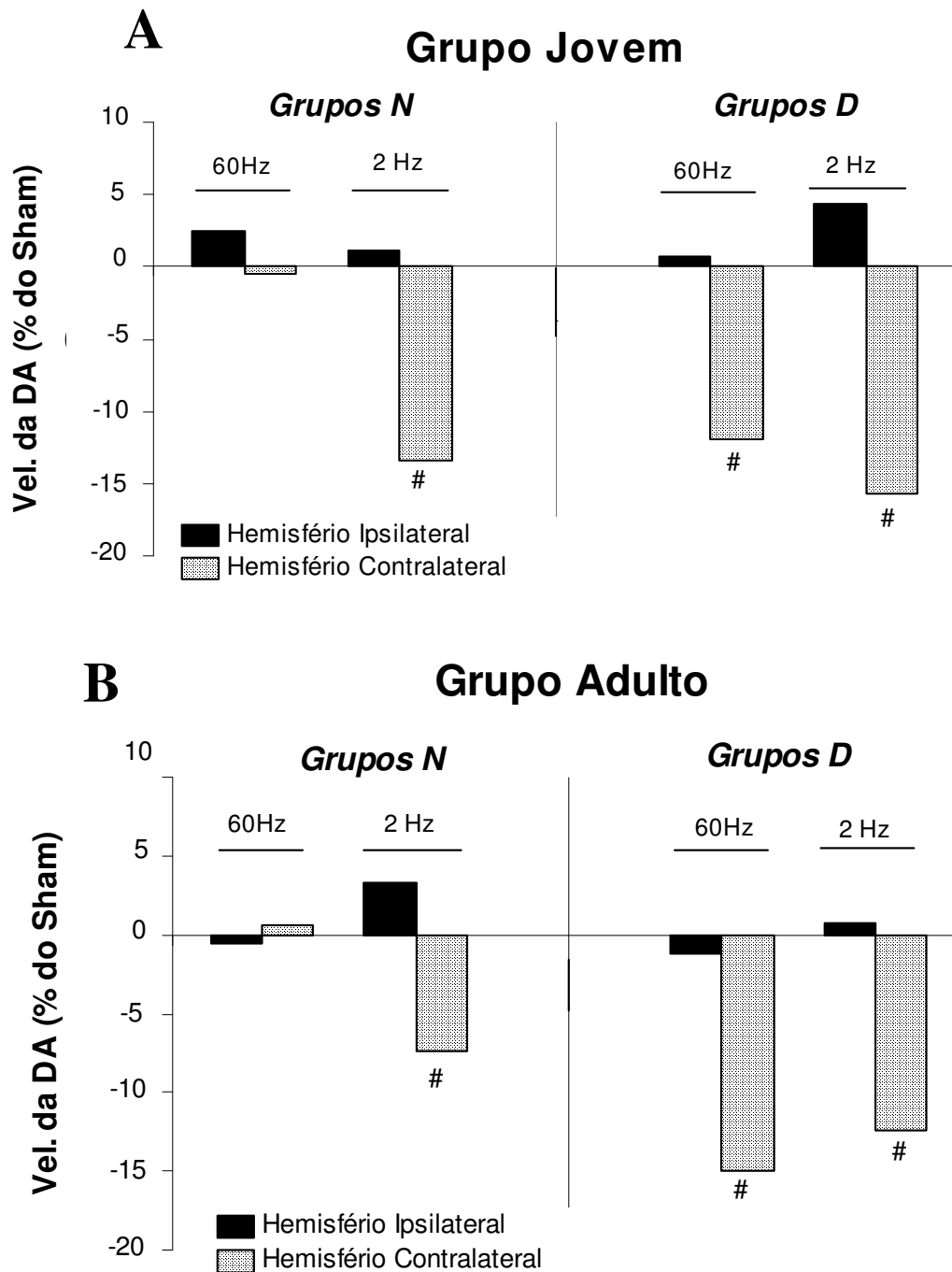


## RATOS ADULTOS (95-105 DIAS)



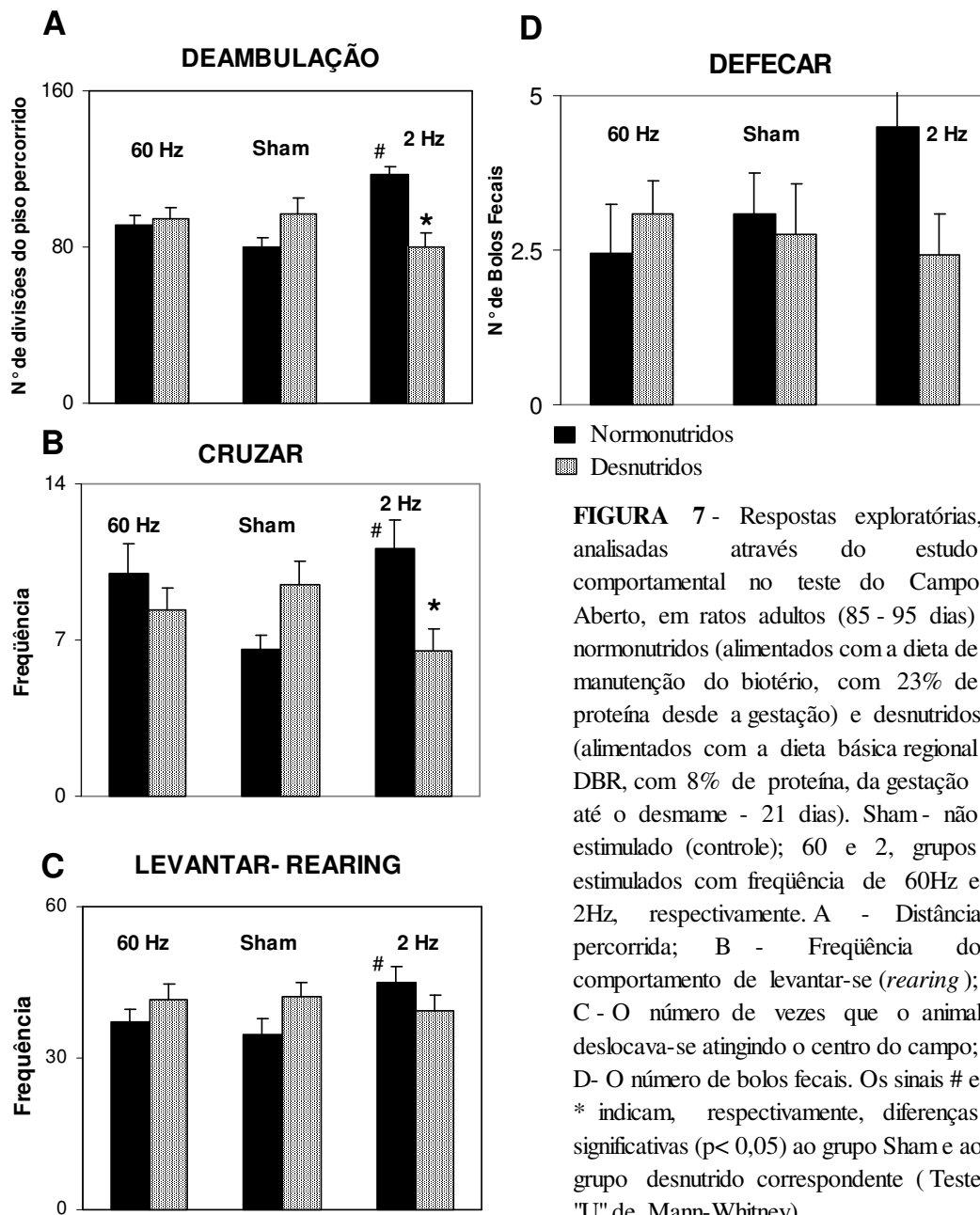
**FIGURA 5-** Registros da variação lenta de voltagem (VLV) e da atividade elétrica espontânea (ECoG) no córtex fronto-parietal do hemisfério contralateral à EP de seis ratos adultos (95-105 dias de vida), sendo 3 normotróficos e 3 desnutridos (**Grupos N e D**, respectivamente), amamentados por mães que receberam, desde a gestação até o desmame, a dieta de manutenção do biotério [DMB], com 23% de proteína, ou a dieta básica regional -DBR, com 8% de proteína. Após o desmame, todos receberam a DMB. Dos 7 aos 28 dias de vida, foram submetidos a eletroestimulação periférica com frequências de 2Hz ou 60 Hz (**N-2**, **N-60**, **D-2** e **D-60** respectivamente). “**Sham**”, grupos não estimulados. O desenho à direita mostra a posição dos eletrodos registradores 1 e 2 e a posição do eletrodo de referência (R), sobre os ossos nasais. A DA foi deflagrada aplicando-se KCl a 2% no orifício parietal posterior, no tempo indicado pelas setas (1 minuto). A barra de calibração vertical indica 10mV para a VLV e 1mV para ECoG





**FIGURA 6 A e B-** Redução das velocidades de propagação da depressão alastrante (% do Grupo “sham”, não estimulado) em ratos jovens (35-45 dias de vida; Figura 6-A) e adultos (95-105 dias; Figura 6-B), normonutridos e desnutridos (**Grupos N e D**, respectivamente), amamentados por mães que receberam, desde a gestação até o desmame, a dieta de manutenção do biotério [DMB], com 23% de proteína, ou a dieta básica regional -DBR, com 8% de proteína. Após o desmame, todos receberam a DMB. “sham” - não estimulado (controle); **60** e **2**, grupos estimulados com frequência de 60Hz e 2Hz, respectivamente. O sinal # indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), em comparação com o grupo “sham” (ANOVA e Teste Tukey).





**TABELA 5-** Velocidades médias de propagação da depressão alastrante em ratos jovens (35-45 dias de vida) e adultos (95-105 dias), normonutridos e desnutridos (**Grupos N e D**, respectivamente), amamentados por mães que receberam, desde a gestação até o desmame, a dieta de manutenção do biotério [**DMB**], com 23% de proteína, ou a dieta básica regional **-DBR**, com 8% de proteína. Após o desmame, todos receberam a DMB. “**Sham**” - não estimulado (controle); **60** e **2**, grupos estimulados com frequência de 60Hz e 2Hz, respectivamente. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ), dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra na coluna da esquerda (ANOVA e teste de Tukey). O sinal # indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) inter-hemisférica (teste t pareado).

	<b>Velocidades da Depressão Alastrante (mm/min)</b>			
	<b>Hemisfério Ipsilateral</b>		<b>Hemisfério Contralateral</b>	
	<b>1° Hora</b>	<b>2° Hora</b>	<b>1° Hora</b>	<b>2° Hora</b>
<b>GRUPOS JOVENS</b>				
<b>N-Sham (a)</b>	3,73 $\pm$ 0,25 (20)	3,67 $\pm$ 0,31 (20)	3,76 $\pm$ 0,29 (20)	3,72 $\pm$ 0,25 (20)
<b>N-60 (b)</b>	3,78 $\pm$ 0,25 (21)	3,79 $\pm$ 0,29 (21)	3,76 $\pm$ 0,40 (21)	3,68 $\pm$ 0,45 (21)
<b>N-2 (c)</b>	3,75 $\pm$ 0,19 (20)	3,74 $\pm$ 0,17 (20)	3,30 $\pm$ 0,39 <sup>a,b,#</sup> (20)	3,18 $\pm$ 0,37 <sup>a,b,#</sup> (19)
<b>D-Sham (d)</b>	4,21 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup> (16)	4,17 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup> (16)	4,24 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup> (16)	4,18 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup> (16)
<b>D-60 (e)</b>	4,23 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup> (19)	4,22 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup> (19)	3,73 $\pm$ 0,50 <sup>d,#</sup> (19)	3,69 $\pm$ 0,51 <sup>d,#</sup> (19)
<b>D-2 (f)</b>	4,39 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup> (18)	4,44 $\pm$ 0,54 <sup>c</sup> (18)	3,58 $\pm$ 0,44 <sup>d,#</sup> (18)	3,51 $\pm$ 0,35 <sup>d,#</sup> (18)
<b>GRUPOS ADULTOS</b>				
<b>N-Sham (a)</b>	3,00 $\pm$ 0,06 (17)	3,18 $\pm$ 0,08 (17)	3,17 $\pm$ 0,09 (17)	3,37 $\pm$ 0,07 (17)
<b>N-60 (b)</b>	3,36 $\pm$ 0,13 (16)	3,34 $\pm$ 0,12 (16)	3,37 $\pm$ 0,14 (16)	3,36 $\pm$ 0,17 (16)
<b>N-2 (c)</b>	3,49 $\pm$ 0,11 (16)	3,46 $\pm$ 0,11 (16)	3,17 $\pm$ 0,10 <sup>a,b,#</sup> (16)	3,06 $\pm$ 0,13 <sup>a,b,#</sup> (15)
<b>D-Sham (d)</b>	4,15 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup> (13)	4,10 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup> (13)	4,14 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup> (13)	4,13 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> (13)
<b>D-60 (e)</b>	4,09 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup> (13)	4,08 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup> (13)	3,54 $\pm$ 0,13 <sup>d,#</sup> (13)	3,48 $\pm$ 0,18 <sup>d,#</sup> (13)
<b>D-2 (f)</b>	4,19 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup> (11)	4,13 $\pm$ 0,29 <sup>c</sup> (11)	3,65 $\pm$ 0,20 <sup>c,d,#</sup> (11)	3,59 $\pm$ 0,29 <sup>c,d,#</sup> (11)

## 7. DISCUSSÃO

Os dados do presente trabalho demonstraram que a eletroestimulação periférica (**EP**) durante o desenvolvimento pode alterar permanentemente, ou ao menos de forma duradoura, a susceptibilidade cortical ao fenômeno da depressão alastrante (**DA**) bem como a atividade exploratória do animal na idade adulta. Além disso, verificou-se que tais alterações parecem depender da frequência de **EP** utilizada e do estado nutricional precoce do animal. Esses resultados serão discutidos com base nos dados da literatura, apresentando-se quando pertinente, os mecanismos possíveis para explicar os efeitos observados.

A evolução ponderal dos diferentes grupos foi determinada, uma vez que, o peso corporal é de fácil obtenção e é um bom indicador do estado nutricional global do organismo. Nos grupos desnutridos, os pesos corporais apresentaram-se mais baixos do que aqueles dos animais normonutridos, em todas as idades avaliadas. Assim, pode-se concluir que a “dieta básica regional” (**DBR**), administrada às nutrizas durante o aleitamento, foi eficaz em produzir desnutrição nos filhotes. Este impacto negativo da **DBR** no início da vida, sobre o peso corporal, confirma resultados anteriores de diversos autores (SILVA *et al.*, 1987; GUEDES *et al.*, 1987b; ANDRADE *et al.*, 1990; TEODÓSIO *et al.*, 1990; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997; SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000; PONTES-PESSOA *et al.*, 2000; GUEDES *et al.*, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2004; AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006). É provável que a **DBR** administrada apenas no aleitamento, modifique a quantidade e a qualidade do leite materno levando à deficiência nutricional nos filhotes lactentes. Isso já foi demonstrado em ratas cronicamente desnutridas pela **DBR** (WANDERLEY, 2003). A esse respeito, é interessante mencionar que o leite de ratas lactantes, submetidas a modelos distintos de

desnutrição, apresentou alterações nas concentrações de proteínas e lactose, bem como diminuição na quantidade produzida (RASMUSSEN, 1998).

Rocha-de-Melo e Guedes (1997) observaram que, aos 90 dias de idade, os animais previamente desnutridos pela **DBR** permaneceram com seus pesos corporais menores do que os controles, alimentados com 23% de proteína. Esses dados contrastam com os do presente estudo, no qual se observou uma recuperação do estado nutricional, avaliado pelo peso corporal, nos animais desnutridos, aos 90 dias. Essa divergência entre resultados pode ser devida à diferença nas dietas controle, empregadas na recuperação nutricional após o desmame, “Anderson Clayton do Brasil”, no estudo de Rocha-de-Melo e Guedes (1997), e “Purina do Brasil” utilizada na presente pesquisa.

Do mesmo modo que Carughi *et. al* (1989), nenhuma influência da estimulação sensorial foi observada sobre o peso corporal no presente estudo. Com relação às características físicas dos pelos e da pele (textura e coloração) nenhuma diferença entre os grupos estimulados (**EP**) e não-estimulados (“**sham**”) foi encontrada. Essa observação contrasta com aquelas de Lima (1992) e de Santos-Monteiro (1995), que, ao invés de **EP**, utilizaram estimulação multi-sensorial e encontraram uma melhora das características físicas dos pelos e da pele, acima mencionadas. Portanto, pode-se sugerir que a ativação de uma única via (no presente trabalho, a via somestésica), no início da vida, não influiria apreciavelmente no peso corporal, e nem no aspecto físico do animal, ao contrário da estimulação multi-sensorial acima referida.

No presente trabalho, as medidas do peso úmido e seco do cerebelo e dos hemisférios cerebrais direito (contralateral) e esquerdo (ipsilateral) foram analisadas, uma vez que esse parâmetro, é de obtenção relativamente fácil e pode ser usado como um indicador de alterações estruturais do sistema nervoso. A avaliação ponderal do

cerebelo pretendeu verificar se a EP influenciou o seu peso. Nenhuma diferença foi apresentada nos pesos (seco e úmido) do hemisfério contralateral à **EP** ao serem comparados aos do ipsilateral, bem como, ao hemisfério correspondente dos animais “**sham**”. Este dado sugere que a **EP** com 2 e 60Hz aplicada durante o desenvolvimento não interferiu nos pesos encefálicos. Por outro lado, os dados do presente estudo mostraram que nos animais desnutridos, o peso do cerebelo e dos hemisférios cerebrais direito e esquerdo são menores quando comparados aos normonutridos, confirmando dados anteriores (TEODÓSIO *et al.*, 1990; SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000). Dependendo da intensidade, a desnutrição no início da vida, pode reduzir o peso encefálico total. Essa redução resulta provavelmente do menor número e/ou menor tamanho dos elementos celulares, bem como de alterações nos processos de maturação neuronal, levando a diminuição da arborização dendrítica, sináptica e da mielinização (MORGANE *et al.*, 1993, PICANÇO-DINIZ *et al.*, 1998; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2004).

Com relação aos efeitos da **EP** sobre a **DA**, os presentes resultados indicaram que a **EP** reduziu a susceptibilidade cortical a esse fenômeno (velocidades de propagação mais baixas nos grupos **EP** do que nos grupos “**sham**”). Esses dados confirmam os de Santos-Monteiro *et al.* (2000), em ratos submetidos à estimulação multi-sensorial. No entanto, em animais normonutridos, o efeito da **EP** parece depender da frequência empregada, uma vez que apenas a **EP** de menor frequência (2Hz) produziu redução significativa na velocidade da **DA**. Assim, embora os dois paradigmas aqui comparados (**EP** e estimulação multi-sensorial) tenham impactos diferentes sobre o aspecto físico dos animais (pele e pelos), exercem efeitos semelhantes sobre a susceptibilidade cortical à **DA**.

A estimulação elétrica repetitiva de vias neurais periféricas pode interferir no funcionamento do SNC, mesmo em indivíduos adultos (KANEKO *et al.*, 1994; TOKIMURA *et al.*, 2000, KAELIN-LANG *et al.*, 2002). Apesar dos mecanismos envolvidos nestes efeitos ainda não serem bem estabelecidos, algumas hipóteses têm sido sugeridas. Uma possível explicação é que a **EP** poderia gerar uma reorganização de conexões neuronais, originando mudanças em sua excitabilidade, o que se denomina plasticidade cortical. O cerebelo e o córtex cerebral são conhecidos por desenvolver facilmente plasticidade (YANG *et al.*, 2005). Esta é definida com base em algumas mudanças persistentes nas propriedades corticais, tais como alterações nas conexões intercelulares e na eficácia sináptica (FRASER *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que os efeitos dependentes da frequência da **EP** seriam baseados na mudança desta eficácia sináptica (FRASER *et al.*, 2002; LO *et al.*, 2005). Por exemplo, quando uma sinapse é estimulada com alta frequência, observa-se geralmente um aumento subsequente de sua eficácia de transmissão, isto é, a célula pós-sináptica passa a responder de forma aumentada a um estímulo pré-sináptico. Por outro lado, uma estimulação de baixa frequência resulta geralmente na redução prolongada da transmissão sináptica. Tais efeitos, conhecidos respectivamente como potenciação e depressão de longo prazo, resultariam em alterações na excitabilidade cortical (FRASER *et al.*, 2002, MALENKA & BEAR., 2004).

A plasticidade mencionada acima, induzida pela estimulação sensorial, seria ativada ou inibida por mecanismos que envolvem neurotransmissores inibitórios e/ou excitatórios. Com respeito aos neurotransmissores inibitórios, a modulação da excitabilidade da área motora cortical, subsequente a um período de **EP**, seria, segundo alguns autores, marcadamente influenciada por mecanismos GABAérgicos (BÜTEFISCH *et al.*, 2000; KAELIN-LANG *et al.*, 2002). Esses autores sugerem que a

ativação neural de baixa frequência (1 ou 2 Hz) pode modular a função cortical do **GABA**, diminuindo sua inibição. O **GABA**, principal neurotransmissor inibitório no cérebro, é ativamente envolvido em processos de organização cortical cerebral (ZHENG & KNUDSEN, 1999; FELDMAN, 2000). Ele participa de propriedades plásticas dos neurônios, em respostas a estímulos elétricos, nas áreas sensoriais e não-sensoriais corticais de animais (JONES, 1993). Os neurônios e receptores GABAérgicos parecem também participar na modulação da propagação da **DA**. O uso do seu agonista Diazepam facilitou essa propagação (GUEDES *et al.*, 1992; GUEDES & CAVALHEIRO, 1997), enquanto o uso de seu antagonista Picrotoxina (BURES *et al.*, 1975; GUEDES *et al.*, 1992) e Bicuculina (GUEDES *et al.*, 1992) a reduziu.

Além do possível papel de neurotransmissores inibitórios, como analisado acima, a participação de neurotransmissores excitatórios deve também ser considerada. Essa proposição, aparentemente paradoxal, passa a fazer sentido, se for considerado que os dois tipos de neurotransmissores atuam de forma interdependente, sobretudo em modificações envolvendo plasticidade neural. Por exemplo, Bütefisch *et al.* (2000) sugerem que a ativação de receptores **NMDA** é necessária para a manifestação da plasticidade cortical dependente do uso de uma via motora. Esses autores demonstraram que o bloqueio de receptores do tipo **NMDA** pelo dextrometorphan reduziu essa plasticidade, o que indicaria a participação do sistema de aminoácidos excitatórios na plasticidade cortical. Por outro lado, também tem sido verificado que a ativação de receptores do tipo **NMDA** reduz as velocidades de propagação da **DA**, podendo seus agonistas deflagrar o fenômeno, se aplicados em grandes concentrações (GUEDES *et al.*, 1988). Essas evidências sugerem uma possível influência dos neurotransmissores excitatórios nos efeitos da **EP**, aplicada no início da vida, sobre a susceptibilidade cortical à **DA**.

Pesquisas recentes sugerem que a ativação de vias sensoriais por meio da **EP** resultaria em alterações na excitabilidade do córtex (RIDDING *et al.*, 2000; KAELIN-LANG *et al.*, 2002; LO *et al.*, 2005), provavelmente pelos mecanismos citados acima. Mudanças duradouras da excitabilidade cortical parecem também estar causalmente associadas a alterações na propagação da **DA**. Há algumas evidências de que a sua velocidade de propagação se correlacione com, ou represente um índice para a excitabilidade cortical (LIEBETANZ *et al.*, 2006). A propagação da **DA** é afetada por alterações iônicas (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 1974; GUEDES & DO CARMO, 1980) e de neurotransmissores que similarmente alteram a excitabilidade cortical (RAMSON, 1974; OGATA, 1978; CALDECOTT-HAZARD *et al.*, 1982; BRAILOWSKY *et al.*, 1988). A **DA** é também afetada por outras condições, que são associadas com uma alteração da excitabilidade cortical, como distúrbios nos níveis de glicose sanguínea (XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ & GUEDES, 2001; COSTA-CRUZ *et al.*, 2006) e mudanças das concentrações de aminoácidos excitatórios (MARTINS-FERREIRA *et al.*, 2000). No entanto, os mecanismos que relacionam alterações na excitabilidade cortical com modificações na susceptibilidade à **DA** ainda não estão claros. É provável, portanto, que a **EP** de 2 Hz tenha alterado a excitabilidade cortical, mediada por mecanismos dependentes da ação de neurotransmissores, similares àqueles vistos na depressão- ou na potenciação de longo prazo, e, como consequência, tenha diminuído as velocidades da **DA** por razões ainda pouco conhecidas.

A **EP** de 2Hz, mas não a de 60 Hz, reduziu a susceptibilidade cortical à **DA**, a julgar pelas velocidades mais baixas quando comparadas às dos grupos sem **EP**. Esses resultados parecem ser na mesma direção dos de Albensi *et al.* (2004), que utilizaram estimulação elétrica cortical (**EC**) em ratos. Com baixa frequência (2Hz), esses autores



observaram uma inibição gradual, mas duradoura da atividade epileptiforme, enquanto a **EC** de alta frequência (100Hz) produziu um efeito inibitório imediato, no entanto não duradouro. Se os mecanismos de ação da **EP** forem os mesmos da **EC**, pode-se postular que talvez a **EP** com 60 Hz aplicada no presente estudo tenha alterado temporariamente a susceptibilidade cortical à **DA**, mas esse efeito não teria durado o suficiente para ser registrado 7-17 dias (35-45 dias de idade) após o fim da aplicação da **EP** (28° dia). Para verificar esta hipótese, seria necessário que os registros eletrofisiológicos fossem realizados durante ou imediatamente após a **EP**, o que poderá ser realizado futuramente.

Outra possibilidade para explicar a ausência de efeito da **EP** de 60Hz seria baseada na região do SNC afetada pela **EP**. Por exemplo, **EP** de 2Hz produz um significativo aumento na liberação de encefalina no córtex, enquanto 100Hz aumenta a liberação de dinorfina na medula espinhal (HAN, 2003). Ou seja, com relação à liberação de opióides, a **EP** de alta frequência produziu efeito fora do córtex. Com respeito aos efeitos dependentes da frequência da **EP**, o presente estudo confirma pesquisas que demonstraram que a **EP**, em frequências variando de 1 a 100 Hz, pode induzir respostas neuronais específicas no SNC (FEI *et al.*, 1986; HAN e SUN, 1990; HAN, 2003; YANG *et al.*, 2005). Estas evidências sugerem a existência, no SNC, de centros específicos para codificar informações ambientais em função de suas frequências. Apesar dos esforços sistemáticos para entender os mecanismos centrais de codificação de frequências, estes ainda permanecem desconhecidos.

Conforme discutido acima, os efeitos inibitórios da **EP** de baixa frequência (2Hz), sobre a **DA**, e a ausência de alterações da **EP** de 60 Hz, sugerem a participação de diferentes mecanismos neurais. No entanto, investigações futuras são necessárias para confirmar os mecanismos propostos.

Em relação à deficiência nutricional, a **DBR** imposta aos animais no período de aleitamento, produziu um efeito facilitador sobre a **DA** cortical, nas duas idades avaliadas, a julgar pelas maiores velocidades de propagação nos grupos desnutridos na condição “**sham**” (não estimulados) em comparação com os respectivos grupos nutridos. Essa maior susceptibilidade à **DA** encontrada neste estudo confirma achados anteriores (GUEDES, 1984; GUEDES *et al.*, 1987b; ANDRADE *et al.*, 1990; XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991; GUEDES *et al.*, 1996; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997; SANTOS-MONTEIRO *et al.*, 2000; AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006) e evidencia, mais uma vez, a grande sensibilidade do córtex à deficiência nutricional, sobretudo no aleitamento. Este, como se sabe, constitui no rato o período “crítico” ou de maior vulnerabilidade do sistema nervoso a agressões externas, como a deficiência nutricional (DOBBING, 1968).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o efeito da desnutrição sobre a susceptibilidade do córtex ao fenômeno da **DA**. A mielinização deficiente, a maior densidade de “empacotamento” celular e alterações da proporção neurônio/glia, dos sistemas de neurotransmissores e do metabolismo energético provocados pela desnutrição precoce, podem estar envolvidos nos efeitos observados sobre a **DA**. No entanto, o presente estudo não visa discutir os mecanismos relacionados aos efeitos da desnutrição sobre a **DA**, uma vez, que isto tem sido feito por inúmeros estudos (DE LUCA *et al.*, 1977; GUEDES *et al.*, 1987b; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997).

A inclusão de grupos precocemente desnutridos na presente investigação foi dirigida especialmente à avaliação do possível impacto do estado nutricional sobre os efeitos da **EP** na susceptibilidade cortical à **DA**. Portanto, os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações neurais, provocadas pelas **EP** associada à desnutrição no início da vida, que poderiam estar relacionadas ao fenômeno da **DA**, serão discutidos,

com base em evidências da literatura. Como mencionado anteriormente, no presente estudo os efeitos da **EP** precoce, com 60 Hz, mas não com 2 Hz, foram modificados pelo estado nutricional no início da vida. A **EP** com 60 Hz, que não havia tido efeito sobre a **DA** no grupo normonutrido, reduziu significativamente a velocidade da **DA** no grupo desnutrido, em ambas as faixas etárias testadas (jovens e adultos). A interação do estado nutricional precoce com os efeitos da **EP**, sobre as velocidades da **DA**, ainda é desconhecida, mas algumas hipóteses podem ser discutidas. Tem sido demonstrado que os efeitos neurais da **EP** são geralmente dependentes da frequência utilizada, sugerindo, assim, a existência de abordagens específicas para codificar as informações ambientais de diferentes frequências (YANG *et al.*, 2005). Por exemplo, os núcleos arqueado (no hipotálamo) e parabraquial (na região pontina bulbar) têm sido apontados como tendo um papel crucial na codificação dos efeitos de analgesia induzida pela **EP** de baixa e alta frequência, respectivamente (WANG *et al.*, 1990a,b; 1991). Se uma tal estratégia, de codificação dependente da frequência, existir para os efeitos da **EP** sobre a **DA**, então seria razoável postular que a desnutrição no início da vida pudesse modificar essas propriedades de codificação neural, o que poderia ajudar a explicar os presentes achados.

Um outro fator que pode ter contribuído para os efeitos da desnutrição sobre a ação da **EP** na **DA**, seria representado por modificações na atividade de sistemas de neurotransmissores nos animais desnutridos. Como vimos, os efeitos da **EP** sobre a **DA** podem também estar associados com neurotransmissores excitatórios (glutamatérgico e colinérgico) ou inibitórios (GABAérgico). Por exemplo, estudos demonstraram que as atividades dos sistemas colinérgico e GABAérgico encontram-se diminuídas no córtex em animais desnutridos (STERN *et al.*, 1974; WIGGINS *et al.*, 1984).

Com relação aos efeitos comportamentais, tem sido mostrado em diferentes testes que a exposição à ativação multi-sensorial, por meio da estimulação ambiental, aumenta o comportamento exploratório dos animais (RENNER & ROSENZWEIG, 1987; FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1991; ESCORIHUELA *et al.*, 1994). O presente trabalho confirma esses dados, a julgar pelo aumento no comportamento exploratório dos animais adultos após a aplicação de **EP** no início da vida. Estes efeitos comportamentais, assim como aqueles eletrofisiológicos, parecem ser dependentes da frequência de **EP** empregada e do estado nutricional precoce do animal.

Os mecanismos pelos quais a estimulação ambiental precoce pode produzir mudanças comportamentais na idade adulta ainda não estão claros. Como mencionado previamente, a exposição ao enriquecimento ambiental no período crítico de desenvolvimento leva a uma série de processos neuroquímicos que resultam em plasticidade (ROSENZWEIG & BENNETT, 1996; GSCHANES *et al.*, 1997). Aumento do crescimento cerebral, da densidade neuronal e dos contatos sinápticos, bem como do tamanho dos núcleos neuronais e dos números de ramificações dendríticas, tem sido descrito após estimulações multi-sensoriais no período pós-natal (DIAMOND, 1967; GREENOUGH *et al.*, 1990). Uma das conseqüências da ativação repetida de vias sensoriais seria modificar a liberação de neurotransmissores, com a resultante modificação da atividade neural correspondente, levando a mudanças plásticas neurais. Estas mudanças plásticas poderiam estar envolvidas também no aumento da atividade exploratória observados nos animais submetidos à **EP** no início da vida.

Tem sido sugerido o envolvimento de agonistas e antagonistas de opióides, nas atividades exploratórias de animais. Sabe-se que agonistas de opióides facilitam, enquanto antagonistas inibem, o comportamento exploratório (KATZ, 1979; KATZ & GELBART, 1978). Tem sido proposto que **EP** talvez cause uma liberação de opióides

endógenos no SNC e que esta dependeria da frequência empregada (HAN & SUN, 1990; HAN, 2003; CHEN *et al.*, 2005). Por exemplo, **EP** de 2Hz poderia estimular a liberação de peptídeos opióides endógenos como encefalinas e endorfinas (GUO *et al.*, 1996; HAN, 2003; Chen *et al.*, 2005), em contraste com a **EP** de alta frequência (100Hz) a qual não interfere nos níveis destes neuropeptídeos (HAN, 2003).

Como mencionado em métodos, alterações da emocionalidade do animal podem ser inferidas por mudanças na frequência de emissão de bolos fecais durante a sessão de observação comportamental. No presente estudo, nenhuma alteração foi observada no número de bolos fecais eliminados pelos animais estimulados (Grupos 2 e 60) quando comparados aos não estimulados (Grupo “**sham**”). Esses dados contrastam com os de outros estudos, que relatam uma diminuição na frequência de defecação em animais previamente estimulados por vias sensoriais (ADER, 1959; LEVINE *et al.*, 1967; BODNOFF *et al.*, 1987). As discrepâncias entre os resultados desses autores e os do presente trabalho podem ser devidas às diferentes características dos procedimentos de estimulação precoce utilizados nos estudos experimentais (por exemplo: tipo, intensidade e duração da estimulação).

Com relação aos efeitos da desnutrição precoce sobre a atividade exploratória, sabe-se que, no rato, os efeitos comportamentais da **EP** parecem depender do estado nutricional no início da vida (LEVITSKY & BARNES, 1972). É bem estabelecido que a desnutrição causa alterações nas atividades comportamentais, sendo as mais afetadas: a atividade geral, as reações dos animais a estímulos aversivos, as atividades dependentes da capacidade de aprendizado, bem como as atividades exploratórias (FRANKOVÁ & BARNES, 1968; 1972; CASTELLANO & OLIVERIO, 1976; TEODÓSIO *et al.*, 1979). No presente estudo, em contraste, nenhuma alteração na atividade exploratória foi observada nos animais desnutridos, quando comparados aos

normonutridos. Sabe-se que fatores ambientais não nutricionais podem interagir com a condição nutricional do indivíduo e alterar as mudanças comportamentais causadas pela desnutrição (ROCHA & MELLO, 1994). Portanto, é provável que, para as diferenças do comportamento exploratório, entre os estudos mencionados acima e o presente, tenha contribuído a interação de fatores ambientais e nutricionais. Os fatores ambientais do presente trabalho não incluem apenas a **EP**, mas também uma possível exposição concomitante a outros estímulos ambientais (contato tátil, estímulos visuais e auditivo durante as sessões de **EP** no laboratório- ver métodos), em todos os grupos estudados, inclusive os “**sham**”. Esta possibilidade é suportada por evidências da melhora de parâmetros comportamentais, em crianças desnutridas precocemente, quando submetidas a programas de estimulações psico-sensoriais, associadas à reabilitação nutricional (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 1991).

Os mecanismos pelos quais a desnutrição e a estimulação ambiental precoce podem interagir para produzir mudanças comportamentais na idade adulta ainda não estão totalmente esclarecidos. Em prévios estudos, Rocha e Mello (1994) demonstraram que a desnutrição durante o aleitamento diminui os níveis basais de  $\beta$ -endorfina e inibe sua liberação numa situação nova, em ratos adultos nutricionalmente reabilitados. Pode-se sugerir então que a desnutrição precoce altere a liberação de peptídeos opióides observados durante a estimulação sensorial, inibindo seu efeito sobre a atividade exploratória do animal. Outro possível mecanismo que explicaria a ausência de alterações comportamentais entre os animais desnutridos do presente trabalho, seria a inibição das alterações neurais (histomorfológicas e bioquímicas), provocadas pelas estimulações sensoriais que podem estar relacionadas às atividades exploratórias dos indivíduos.

## 8. CONCLUSÕES

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

- A eletroestimulação periférica (**EP**) com 2Hz, mas não a de 60Hz, aplicada por 3 semanas no início da vida, reduziu a susceptibilidade cortical à **DA** avaliada logo após o término da **EP**;
- Esse efeito da **EP** precoce, sobre a **DA**, pôde ser considerado duradouro, uma vez que permaneceu até a idade adulta (95-105 dias);
- A **EP** com 2Hz, mas não a de 60Hz, durante o desenvolvimento, aumentou a atividade exploratória do animal, avaliada na idade adulta;
- A desnutrição pela **DBR** durante o desenvolvimento além de reduzir os pesos corporais até os 60 dias de idade, modificou os efeitos da **EP** com 60Hz, tornando-os comparáveis aos da **EP** com 2Hz.

## 9. PERSPECTIVAS

Atualmente, tem sido de grande interesse na clínica o tratamento de doenças neurológicas por meio de técnicas não invasivas, sem o uso de drogas ou procedimentos cirúrgicos. A **EP** tem se mostrado uma técnica segura, pouco agressiva, de baixo custo e de grande ajuda para o tratamento de alguns desses distúrbios. O presente estudo alerta para a possibilidade de alterações nos efeitos da **EP** quando associada à desnutrição durante o desenvolvimento cerebral. Assim, algumas perspectivas são sugeridas para complementação dos dados apresentados:

- Avaliar os efeitos imediatos da **EP** sobre a **DA**, no tecido cortical (registrar a **DA** durante o período de **EP**, ou imediatamente pós);
- Avaliar a possibilidade de diferenças regionais corticais, no que se refere aos efeitos da **EP** sobre a **DA**;
- Analisar, em animais jovens, o efeito da **EP** aplicada durante o desenvolvimento sobre características comportamentais;
- Caracterizar os efeitos de uma “curva frequência-resposta” de **EP** sobre a propagação da **DA**;
- Investigar os efeitos da **EP** utilizando fármacos, para testar a atividade dos sistemas glutamatérgico, GABAérgico e de opióides, com vistas a verificar os mecanismos neuroquímicos associados.
- Estudar, nas condições do presente trabalho, as possíveis alterações em canais iônicos das membranas neuronais.



## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER A (1959). The effects of early experience on subsequent emotionality and resistance to stress. *Psychol. monogr*, **73**: 472.

ALBENSI BC, ATA G, SCHMIDT E, WATERMAN JD, JANIGRO D (2004). Activation of long-term synaptic plasticity causes suppression of epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Brain research*, **998**: 56-64.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS A, PINHEIRO PC, LIMA DS, OZIAS MG, OLIVEIRA MB; GUIMARAES NX, GUEDES RCA (2006). Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experimental neurology*, **200**:275-82.

ANDRADE AFD, GUEDES RCA, 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.

ARAÚJO MGR (1997). *Tratamento sistêmico precoce com sumatriptan e efeitos eletrofisiológicos cerebrais no rato adulto, normal e desnutrido*. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

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.

- BEZERRA RS, ABADIE-GUEDES R, MELO FRM, PAIVA AMA, AMÂNCIO-DOS-SANTOS A, 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.
- BIRKE LIA, ARCHER J (1983). Some issues and problems in the study of animal exploration. In: Archer; Birke (Ed): *Exploration in animals and humans*, New York: Nostrand Reinhold, 1-21.
- BODNOFF SR, SURANYI-CADOTTE B, QUIRION R, MEANEY MJ (1987). Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H] flunitrazepam binding in rat brain. *European journal of pharmacology*, **144**: 105-107.
- BRAILOWSKY S, KUNIMOTO M, MENINI C, SILVA-BARRAT S, RICHE D, NAQUET R (1988). The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain research*. **442**: 175-179.
- BURES J, SCHWARZENFELD I, BROZEK G (1975). Blockade of spreading depression by picrotoxin foci of paroxysmal activity. *Epilepsia*, **16**:111-118.
- BÜTEFISCH CM, DAVIS BC, WISE SP, SAWAKI L, KOPYLEV L, CLASSEN J, COHEN LG (2000). Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. *Neurobiology*, **97**: 3661-3665.
- CABRAL-FILHO JE, TRINDADE-FILHO EM, GUEDES RCA (1995). Effect of d-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. *Brazilian journal of medicine and biology research* **28**:347-350.

- CALDECOTT-HAZARD S, SHAVIT Y, ACKERMANN RF, ENGEL JJ, FREDERICKSON RC (1982). Liebeskind JC. Behavioral and electrographic effects of opioids on kindled seizures in rats. *Brain research*, **251**:327-333.
- CASTELLANO C, OLIVERIO A (1976). Early malnutrition and postnatal changes in brain and behavior in the mouse. *Brain research*, **101**:317-325.
- CARUGHI A, CARPENTER KJ, DIAMOND MC (1989). Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. *Journal of nutrition* **119**: 2005-2016.
- CHEN JH, LIANG J, WANG GB, HAN JS, CUI CL (2005). Repeated 2 Hz peripheral electrical stimulations suppress morphine-induced CPP and improve spatial memory ability in rats. *Experimental neurology*, **194**: 550-556.
- CONFORTO AB, KAELIN-LANG A, COHEN LG (2002). Increase in hand muscle strength of stroke patients after somatosensory stimulation. *Annals of neurology*, **51**:122-125.
- COSTA-CRUZ RR, GUEDES RCA (2001). Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neuroscience letters*, **303**:177-180.
- COSTA-CRUZ RRG; AMÂNCIO-DOS-SANTOS A, GUEDES RCA (2006). Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neuroscience letters*, **401**:271-275.

- 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 [proceedings] *Activitas nervosa superior*, **19**:130-131.
- DIAMOND MC (1967). Extensive cortical depth measurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. *Journal of comparative neurology*, **131**:357-364.
- DOBBING J (1968). Vulnerable periods in developing brain. In: Davison AN, Dobbing J *Applied neurochemistry*. Oxford: Blackwell, 287-316.
- ESCORIHUELA RM, TOBENA A, FERNANDEZ-TERUEL A (1994). Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behavioural brain research*, **61**:169-73.
- FEI H, XIE GX; HAN JS (1986). Low and high frequency electroacupuncture stimulations release (Met 5) enkephalin and dynorphin A in rat spinal cord. *Kexue tongbo*, **32**:1496-1501.
- FELDMAN DE (2000). Inhibition and plasticity. *Nature neuroscience*, **3**:303 – 304.
- FERNANDEZ-TERUEL A, ESCORIHUELA RM, DRISCOLL P, TOBENA A, BATTIG K (1991). Infantile (handling) stimulation and behavior in young Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology & behavior*, **50**: 563-565.
- FRANKOVA S, BARNES RH (1968). Influence of malnutrition in early life on exploratory behavior of rats. *Journal of nutrition*, **96**: 477-84.

FRASER C, POWER M, HAMDY S, ROTHWELL J, HOBDAV D, HOLLANDER I, TYRELL P, HOBSON A, WILLIAMS S, THOMPSON D (2002). Driving Plasticity in human adult motor cortex is associated with improved motor function after brain injury. *Neuron*, **34**:831-840.

FROC DJ, CHAPMAN A, TREPEL C, RACINE RJ (2000). Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of the freely moving rat. *The journal of neuroscience*, **20**: 438-445.

FUJII S, KURODA Y, MIURA M, FURUSE H, SASAKI H, KANEKO K, ITO K, CHEN Z, KATO H (1996). The long-term suppressive effect of prior activation of synaptic inputs by low-frequency stimulation on induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Experimental brain research*, **111**:305-312.

GSCHANES A, EGGENREICH U, WINDISCHG M, CRAILSHEIM K (1997). Early postnatal stimulation influences passive avoidance behaviour of adult rats. *Behavioural brain research*, **93**:91-98.

GRANTHAM-MCGREGOR SM, POWELL CA, WALKER SP, HIMES JH (1991). Nutritional supplementation, psychosocial stimulation, and mental development of stunted children:Jamaican study. *The Lancet*, **338**:1-5.

GREENOUGH WT, WHITERS GS, WALLACE CS (1990). Morphological changes in the nervous system arising from behavioral experience:What is evidence that they are involved in learning and memory: In: Squire LR; Lindenlaub E (Eds). *The Biology of memory*, Symposia Medica Hoechst. Stuttgart-New York, 159-185.

GUEDES RCA (1984). On some conditions that influence cortical spreading depression. *Anais acad brasileira de ciências*, **56**:445-455.

GUEDES RCA (1985). O cérebro desnutrido. *Ciência Hoje*, **3**:61-65.

GUEDES RCA (2005). Electrophysiological methods: application in Nutritional Neuroscience. In: Harris R. Lieberman, Robin Kanarek and Chandan Prasad. (Org.). *Nutritional Neuroscience: Overview of an emerging field.*. 1 ed. New York: p. 39-54.

GUEDES RCA, AMÂNCIO-DOS-SANTOS A, MANHÃES-DE-CASTRO R, COSTA-CRUZ RRG (2002). Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutritional neuroscience*, **5**:115-123.

GUEDES RCA, AMORIM LF, TEODÓSIO NR (1996) Effect of aging on cortical spreading depression. *Brazilian journal of medical and biological research*, **29**:1407-1412.

GUEDES RCA, ANDRADE AFD, CABRAL-FILHO JE (1987b). Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. *Brazilian journal of medical and biological research*, **20**:639-642.

GUEDES RCA, ANDRADE AFD, CAVALHEIRO EA (1988). Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: Cavalheiro EA, Lehman J, Turski L (Eds.). *Frontiers in excitatory amino acid research*. New York: Alan R. Liss, 667-670.

GUEDES RCA, AZEREDO FAM, HICKS TP, CLARKE RJ, TASHIRO T (1987a).

Opioid mechanisms involved in the slow potential change neuronal refractoriness during cortical spreading depression. *Experimental brain research*, **69**:113-118.

GUEDES RCA, BARRETO JM (1993). Effect of anesthesia on propagation of cortical spreading depression in rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, **25**:393-397.

GUEDES RCA, CABRAL-FILHO JE, TEODÓSIO NR (1992). GABAergic mechanisms involved in cortical malnourished rats. In: Do Carmo RJ (Ed.). Spreading Depression. *Experimental brain research series*, **23**:17-26.

GUEDES RCA, CAVALHEIRO E (1997). Blockade of Spreading Depression In Chronic Epileptic Rats: Reversion By Diazepam. *Epilepsy research*, **27**:33-40.

GUEDES RCA, DO CARMO RJ (1980). Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Experimental brain research*, **39**:341-349.

GUEDES RCA, PEREIRA-DA-SILVA MS (1993). Effect of pre and postnatal propylthouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. *Brazilian Journal of medicine and biology research*, **26**:1123-1128.

GUO HF, TIAN J, WANG X, FANG Y, HOU Y, HAN J (1996). Brain substrates activated by electroacupuncture of different frequencies (I): Comparative study on the expression of oncogene c-fos and genes coding for three opioid peptides. *Molecular brain research*, **43**:157-166.

- HALL CS (1951) The genetics of behavior. In SS Stevens (Ed): Handbook of *Experimental psychology*, New York: John Wiley and Sons, 304-329.
- HAN JS (2003). Acupuncture:neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *Trends in neurosciences*, **26**:17-21.
- HAN JS, SUN SL (1990). Differential release of enkephalin and dynorphin by low and high frequency electroacupuncture in the central nervous system. *Science international journal*, **1**:19-23.
- JONES EG (1993). GABAergic, neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cerebral cortex*, **3**: 361-372.
- KAELIN-LANG A, LUFT AR, SAWAKI L, BURSTEIN AH, SOHN YH, COHEN LG (2002). Modulation of human corticomotor excitability by somatosensory input. *Journal of physiology*, **540.2**:623-633.
- KANEKO T, CARIA MA, ASANUMA H (1994). Information processing within the motor cortex. II. Intracortical connections between neurons receiving somatosensory cortical input and motor output neurons of the cortex. *The Journal of comparative neurology*, **345**:172-184.
- KATZ RJ (1979). Naltrexone antagonism of exploration in the rat. *International journal of neuroscience*, **9**: 49-51.
- KATZ RJ, GELBART J (1978). Endogenous opiates and behavioral. responses to environmental novelty. *Behavioral and neural biology*, **24**: 338-348.
- LEÃO AAP (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of neurophysiology*, **7**:359-390.



- LEÃO AAP (1947). Further observations on the spreading depression of activity in cerebral cortex. *Journal of neurophysiology*, **10**:409-414.
- LEÃO AAP (1951). The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, **3**:315-321.
- LEVITSKY DA; Barnes RH (1972). Nutritional and environmental interactions in behavioral development of the rat: long-term effects. *Science*, **176**: 68-71.
- LEVINE S, HALTMEYER GC, KARAS GG, DENENBERG VH (1967). Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology and behavior*, **2**: 55-59.
- LIEBETANZ D, FREGNI F, MONTE-SILVA KK, OLIVEIRA MB, AMANCIO-DOS-SANTOS A, NITSCHKE MA, GUEDES RCA (2006). After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neuroscience letter*, **398**:85-90.
- LIMA JG (1992). *Estudo morfológico e morfométrico do corpo caloso de ratos submetidos a diferentes tipos de dieta e à estimulação sensorial e ambiental*. Ribeirão Preto: Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 104p.
- LO YL, CUI SL, FOOK-CHONG S (2005). The effect of acupuncture on motor cortex excitability and plasticity. *Neuroscience letters*, **384**:145-149.
- MALENKA RC, BEAR MF (2004). LTP and LTD: Review An Embarrassment of Riches *Neuron*, **44**:5-21.

- MARTINS-FERREIRA H, DE OLIVEIRA CASTRO G, STRUCHINER CJ, RODRIGUES PS (1974). Circling spreading depression in isolated chick retina. *Journal of neurophysiology*, **37**:773-784.
- MARTINS-FERREIRA H, NEDERGAARD M, NICHOLSON C (2000). Perspectives on spreading depression. *Brain research reviews*, **32**:215-234.
- MCLAREN, DS, PELLETT, PL (1970) Nutrition in the Middle East. *World Review in Nutrition and Dietetics* 12:43-127.
- MEDEIROS MC (1996). Composição lipídica da dieta e depressão alastrante cortical: estudo eletrofisiológico. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.
- 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, *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **17**:91-128.
- 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 biobehavioral reviews*, **2**:137-230.
- NAHAS TR (1999). O teste do campo aberto. Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, 197p.
- OGATA N (1978). Possible explanation for inter-ictal transition: evolution of epileptiform activity in hippocampal slices by chloride depletion. *Experientia*, **34**:1035-1036.

- 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.
- PICANÇO-DINIZ CW, ARAÚJO MS, BORBA JMC, GUEDES RCA (1998). NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional neuroscience*, **1**:35-48.
- PONTES-PESSOA DCN, LAGO ES, TEODÓSIO NR, BION FM (2000). Dietary proteins on reproductive performance in three consecutive generations of rats. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, **50**: 55-61.
- POWELL J, PANDYAN AD, GRANAT M, CAMERON M, STOTT DJ (1999). Electrical stimulation of wrist extensors in poststroke hemiplegia. *Stroke*, **30**:1384-1389.
- RAMOS-ALIAGA, R (1978) Aspectos bioquímicos y nutricionales en ratas en desarrollo que reciben proteínas de los patrones dietarios de los Andes del Peru. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **28**:378-400.
- RAMSON BR (1974) The behavior of presume glial cells during seizure discharge in cat cerebral cortex. *Brain research*, **69**:83-99.
- RASMUSSEN KM (1998). Effects of Under- and Overnutrition on Lactation in Laboratory Rats. *Journal of nutrition*, **128**: 390–393.
- RENNER MJ, ROSENZWEIG MR (1987). Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior. New York: Springer, 134p.

RIDDING MC, BROUWER B, MILES TS, PITCHER JB, THOMPSON PD (2000).

Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in human subjects. *Experimental brain research*, **131**:135-143.

ROCHA JB, MELLO CF (1994). Handling during suckling alters rat behavior

but does not reverse the deleterious effects of undernutrition on naltrexone-induced inhibition of exploratory activity. *International journal for vitamin and nutrition research*, **64**:152-156.

ROCHA-DE-MELO AP (1994). *Restrição nutricional em distintas fases do aleitamento*

*materno e desenvolvimento cerebral da prole, avaliado no rato adulto*. Dissertação (Mestrado)-Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

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. *Brazilian journal of medical and biological research*, **30**:663-669.

ROCHA-DE-MELO AP, PICANCO-DINIZ CW, BORBA JM, 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. *Nutritional neuroscience*, **7**: 207-216.

ROSENZWEIG MR, BENNET EL (1996). Psychobiology of plasticity: effects of

training and experience on brain and behavior. *Behav brain res*, **78**: 57-65.

SANTOS-MONTEIRO J (1995). *Desnutrição, estimulação ambiental e*

*desenvolvimento do sistema nervoso: um estudo eletrofisiológico*. Recife:

Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 87p.

SANTOS-MONTEIRO J, TEODÓSIO NR, GUEDES RCA (2000). Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in neonatal and early malnourished adult rats. *Nutritional neuroscience*, **3**:29-40.

SIESJÖ BK, BENGTSSON F (1989). Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression: a unifying hypothesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, **9**: 127-140.

SILVA AT, COSTA FBR, COSTA JA, TEODÓSIO NR, CABRAL-FILHO JE, GUEDES RCA (1997) Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human “basic regional diet” of the Northeast of Brazil. *Brasilian journal of medical and Biological research* **20**:383-392.

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.

STERN WC, FORBES WB, RESINICK O, MORGANE PJ (1974). Seizure susceptibility and brain amine levels following protein malnutrition during development in the rat. *Brain research*, **79**:375-384.

TEODÓSIO NR, CABRAL-FILHO JE, GUEDES RCA, COSTA JÁ, COSTA FBR, DA-SILVA AT (1979). Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. *Acta physiologica latino americana*, **29**:255-262.

TEODÓSIO NR, LAGOS ES, ROMANI SAM, GUEDES RCA (1990). A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, **40**:533-547.

TOKIMURA H, DI LAZZARO V, TOKIMURA Y, OLIVIERO A, PROFICE P, INSOLA A, MAZZONE P, TONALI P, ROTHWELL JC (2000). Short latency inhibition of human hand motor cortex by somatosensory input from the hand. *Journal of physiology*, **523**: 503-513.

TRINDADE-FILHO EM (1995) *Efeitos da aplicação do L-triptofano sobre a depressão alastrante de lesão em ratos controle de sono paradoxal*. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

VERÇOSA TC (1997) *Deficiência dietética de triptofano e depressão alastrante cortical*. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

VILELA MCR, MENDONÇA JEF, BITTENCOURT H, LAPA RM, ALESSIO MLM, COSTA MSMO, GUEDES RCA, SILVA VL, ANDRADE-DA-COSTA BLS (2005). Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. *Brain research bulletin*, **64**:395-408.

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.

- WANG Q, MAO L, HAN J (1990a).The arcuate nucleus of hypothalamus mediates low but not high frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Brain research*, **513**:60-66.
- WANG Q, MAO L, HAN J (1990b).The role of periaqueductal gray in mediation of analgesia produced by different frequencies electroacupuncture stimulation in rats. *The International journal of neuroscience*, **53**:167-172.
- WANG Q, MAO L, HAN J (1991).The role of parabrachial nucleus in high frequency electroacupuncture analgesia in rats. *J. Physiol. Sci*, **7**:363-367.
- WIGGINS RC, FULLER G, ENNA SJ (1984). Undernutrition and development of brain neurotransmitter systems. *Life science*, **35**:2085-2094.
- WONG AM, SU TY, TANG FT, CHENG PT, LIAW MY (1999). Clinical trial of electrical acupuncture on hemiplegic stroke patients. *American journal of physical medicine and rehabilitation*, **78**:117-122.
- XIMENES-DA-SILVA A, 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.
- YANG H, CHANG JY, WOODWARD DJ, BACCALA LA, HAN JS, LUO F (2005). Coding of peripheral electrical stimulation frequency in thalamocortical pathways. *Experimental neurology*, **196**: 138-152.
- ZHENG W, KNUDSEN EI (1999).Functional selection of adaptive auditory space map by GABA-mediated inhibition. *Science*, **284**: 962-965.

## **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,<sup>1</sup> Katia K. Monte-Silva,<sup>2</sup> Manuella B. Oliveira,<sup>2</sup> Steven D. Freedman,<sup>1</sup> Alvaro Pascual-Leone<sup>1</sup> and Rubem C. A. Guedes<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratory 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 ( $275 \pm 7$  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

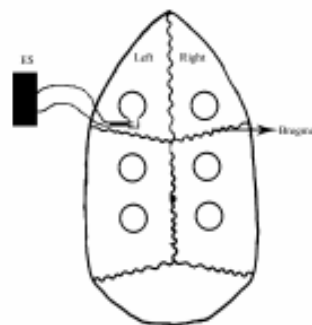


FIG. 1. Schematic illustration showing the location of the three holes in each hemisphere for CSD recording and the location of the electrical stimulating electrode (left prefrontal cortex).

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- $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{A}$ ) 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  $3.5 \pm 0.5$  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  $\text{K}^+$  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 & Obzenovitch, 2001). The two other holes (3–4 mm in diameter) on the parieto-frontal region served as recording sites. The cortical spontaneous electrical activity

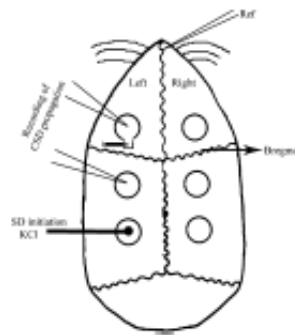


FIG. 2. Schematic illustration showing the location of epidural KCl application (occipital hole) and the location of the two electrodes (parietal and frontal) and the nasal reference for cortical spreading (CSD) recording.

(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  $\mu$ A). We decided to use 600  $\mu$ 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

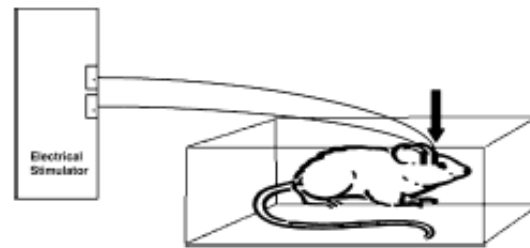


FIG. 3. Schematic illustration depicting the setting that was used for electrical stimulation. During the stimulation, the animals were awake and could move freely in the cage; however, they were placed in a small cage to avoid brisk movements that could detach the connection (cables from stimulator 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 ( $3.84 \pm 0.08$ ,  $3.90 \pm 0.15$ ,  $3.91 \pm 0.10$ ; mean  $\pm$  SD in mm/min for baseline, post-treatment and follow-up, respectively) (Fig. 4A).

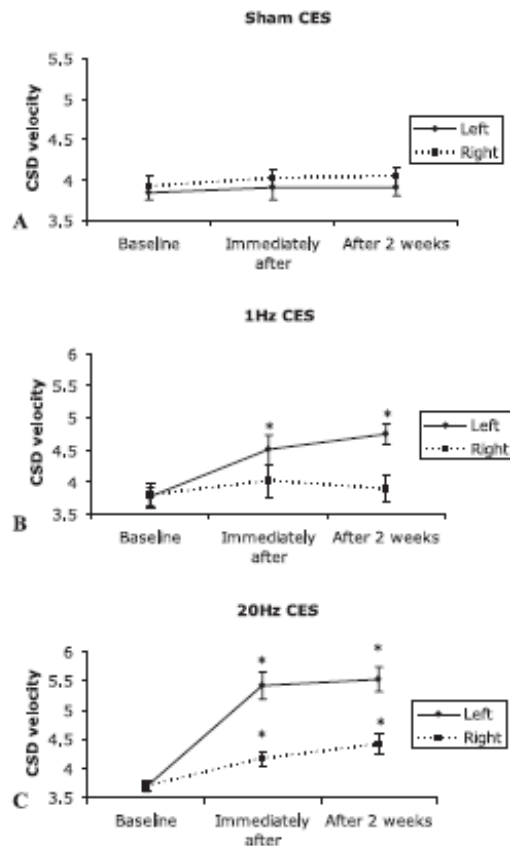


FIG. 4. The effects of electrical stimulation of the left prefrontal cortex on the CSD velocity over the three timepoints (baseline, immediately after stimulation and 2 weeks after stimulation) in the left (stimulated hemisphere) and right (unstimulated) hemisphere. (A) The effects of sham ES. Note that 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% ( $3.76 \pm 0.41$ ;  $4.50 \pm 0.67$ ;  $4.75 \pm 0.46$ ; 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 (Somn & 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 hyperexcitability 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 neurotransmitter 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 cholecystokinin 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  $\mu$ 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 EF 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

- Aron, 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.
- Bighina, 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., Lisansky, 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. & Gunthaus, 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-Cabré, 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., Lomaxev, M., Denslow, S., Li, X. & Ma, C. (2002) Vagus nerve stimulation therapy: a research update. *Neurology*, **59**, S56–S61.
- Gershon, A.A., Dannon, P.N. & Gunthaus, L. (2003) Transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression. *Am. J. Psychiatry*, **160**, 835–845.
- Godsilich, 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. *Nat. 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.
- Hery, 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.
- Hery, C., Vouimba, R.M. & Garcia, R. (1999) Plasticity in the mediolateral 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.
- Jackel, 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., Mital, 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., Neundörfer, 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., Balczak, J.M., Kiek, 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. & Stinger, 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., Tomos, 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. Méd. Liège*, **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, E. & 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., Tomos, 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., Loefer, 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., Anselmi, 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., Velkamp, 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.
- Spirings, E.L. (2003) Pathogenesis of the migraine attack. *Clin. J. Pain*, **19**, 255–262.
- Steward, O., Torre, E.R., Tomasulo, R. & Lofthman, 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., Gmeber, 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., Iokawa, 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, E.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.
- Yoo, 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<sup>a,\*</sup>, Felipe Fregni<sup>b</sup>, Katia K. Monte-Silva<sup>c</sup>, Manuella B. Oliveira<sup>c</sup>,  
Ângela Amâncio-dos-Santos<sup>c</sup>, Michael A. Nitsche<sup>a</sup>, Rubem C.A. Guedes<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Neurophysiology, Georg-August-University, Robert-Koch Strasse 40, 37099 Göttingen, Germany

<sup>b</sup> Harvard Center for Noninvasive Brain Stimulation, Harvard Medical School and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA

<sup>c</sup> 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 anaesthetised rats received either anodal, cathodal or sham tDCS. The stimulation was applied for 20 min at a current strength of 200  $\mu$ 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](mailto: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 ( $377 \pm 45$ 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  $200\ \mu\text{A}$  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 ( $7\ \text{mm}^2$ ) towards the skull. A larger-sized conventional rubber plate electrode ( $10.5\ \text{cm}^2$ ) 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.

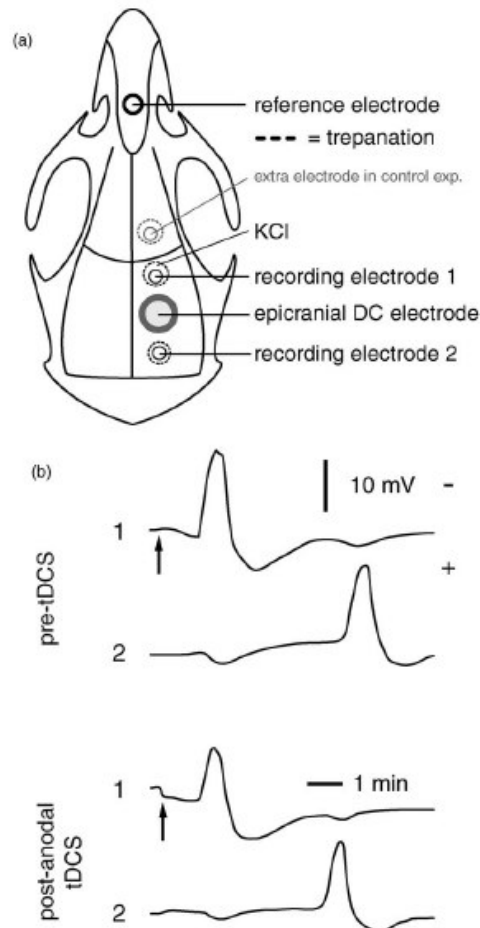


Fig. 1. (a) Graphical illustration of the positions of the epidural recording electrodes and the epicranial tDCS electrode. (b) Examples of CSDs recorded from a frontal (1) and from a caudal electrode (2). CSD was elicited with 2% KCl applied to the frontal cortex at the time-point indicated by the arrow. 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- $\mu$ 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

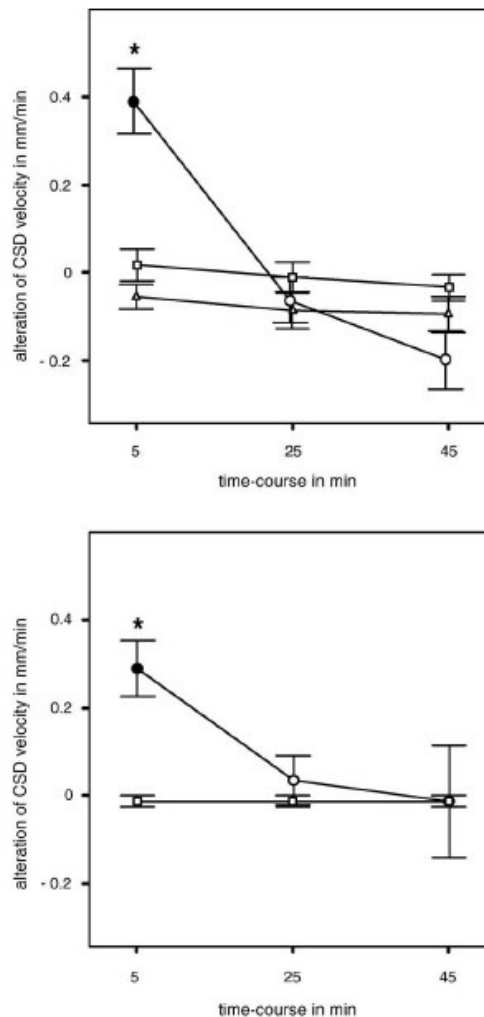


Fig. 2. (a) Time course of the after-effects on the propagation velocity of CSD induced by 20 min of tDCS at a current strength of 200  $\mu$ A. Data are mean deviations from baseline CSD velocity expressed in mm/min ( $\pm$ S.E.M.). Anodal tDCS (circles) produces a significant increase in CSD velocity, 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  $\mu$ 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 visuospatial 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 *Cacnala* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression, *Neuron* 41 (2004) 701–710.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)