

Denise Sandrelly Cavalcanti de Lima

*Suplementação com L-glutamina em ratos lactentes nutridos e
desnutridos: efeitos sobre o fenômeno da depressão alastrante
cortical após o desmame*

**Recife
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Denise Sandrelly Cavalcanti de Lima

***Suplementação com L-glutamina em ratos lactentes nutridos e
desnutridos: efeitos sobre o fenômeno da depressão alastrante
cortical após o desmame***

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

Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

**Recife
2009**

Lima, Denise Sandrelly Cavalcanti de

Suplementação com L-glutamina em ratos lactentes nutridos e desnutridos: efeitos sobre o fenômeno da depressão alastrante cortical após o desmame / Denise Sandrelly Cavalcanti de Lima. – Recife : O Autor, 2009.

68 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Suplementação com L-glutamina – Depressão alastrante cortical. I. Título.

612.3
612.3

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


UFPE
CCS2009-038

Denise Sandrelly Cavalcanti de Lima

*Suplementação com L-glutamina em ratos lactentes nutridos e
desnutridos: efeitos sobre o fenômeno da depressão alastrante cortical
após o desmame*

Dissertação aprovada em: 04 de março de 2009


Banca Examinadora:



Profª Ângela Amâncio dos Santos / UFPE



Profª Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa / UFPE



Profº Luís Bezerra de Carvalho Júnior / UFPE

**Recife
2009**

Dedico este trabalho ao *meu esposo*, pelo amor incondicional, apoio, carinho, paciência e compreensão durante os todos os anos de nossa convivência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu *Deus*, por não ter me desamparado em nenhum momento da minha existência. Ele é quem me fortalece.

Ao meu *esposo*, especificamente por sua paciência e apoio durante os meus períodos de estresse na elaboração desta dissertação.

Aos meus *pais*, pela vida, amor, cuidado e educação.

Aos meus *irmãos*, por tudo que representam em minha vida.

Aos meus queridos *avós maternos (in memorian)* e *paternos*, que foram grandes exemplos de vida para mim.

À minha querida *Tia Dete*, pela importante participação em todas as minhas conquistas. Agradeço-a eternamente por suas orações.

Às estagiárias *E'lida, Lais, Raisal e Rafaela*, pela grande colaboração durante a realização dos experimentos.

À professora *Ângela Amâncio*, que me orientou durante os meus primeiros passos na iniciação científica, pelos conhecimentos repassados e por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas.

À professora *Luciana Maia*, pela paciência em me repassar as técnicas dos procedimentos metodológicos utilizados no presente trabalho, bem como pelo fornecimento de alguns animais.

Às amigas do mestrado *Patrícia, Magdala, Flávia, Janaína e Simone*, com as quais compartilhei momentos inesquecíveis de estudo, de choro e de muitas risadas.

Às amigas do LAFFINT, *Ana Paula, Manu, Angélica*, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao veterinário *Edeones França*, pela colaboração no fornecimento e no manuseio dos animais.

Ao Prof^o Dr. *Rubem Guedes*, pela orientação, pelos conhecimentos repassados e por sua paciência. Ressalto minha sincera admiração por sua dedicação à pesquisa e pelo seu dom na arte de ensinar.

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

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama
Tenzin Gyatso

RESUMO

O aminoácido glutamina (Gln) atua como precursor dos neurotransmissores glutamato e ácido gama-amino-butírico (GABA). Portanto, supõe-se que a sua suplementação dietética possa exercer influência sobre a excitabilidade cerebral. Esta dissertação originou o artigo intitulado **L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats**, atualmente submetido para publicação, e que está apresentado às páginas 25 – 48. O objetivo foi caracterizar em ratos recém-desmamados, bem-nutridos (N) e desnutridos (D), os efeitos da suplementação enteral com Gln durante o período de desenvolvimento do cérebro sobre a depressão alastrante cortical (DAC). Ratos Wistar machos, nas condições N e D, receberam Gln (500mg/Kg/dia) por gavagem do 7º ao 27º dia de vida pós-natal. Dos 30 aos 40 dias de vida, foram submetidos ao registro da DAC durante 4 horas, em dois pontos da superfície cortical parietal do hemisfério direito. A velocidade de propagação foi calculada a partir do tempo requerido para uma onda da DAC atravessar a distância inter-eletrodos. Nas duas condições nutricionais, os ratos suplementados com Gln apresentaram velocidades de propagação da DAC mais elevadas ($p < 0,05$; N-Gln = 4.22 ± 0.23 ; D-Gln = 4.51 ± 0.27 mm/min), quando comparados a um grupo controle tratado com o veículo (água) usado para dissolver a Gln (N-V = 3.77 ± 0.21 ; D-V = 4.15 ± 0.18 mm/min). Este último grupo, não diferiu de um outro grupo controle “ingênuo” (I), que não foi submetido ao procedimento de gavagem (N-I = 3.71 ± 0.16 ; D-I = 4.10 ± 0.11 mm/min). Um quarto grupo, tratado com um aminoácido “placebo” (glicina; Gly), também apresentou velocidade de propagação que não diferiu do controle tratado com água (N-Gly = 3.59 ± 0.24 ; D-Gly = 4.15 ± 0.18 mm/min). A suplementação com Gln não alterou os pesos corporais e encefálicos dos animais em nenhuma das condições nutricionais estudadas. Os resultados indicam que a suplementação com Gln durante o período de desenvolvimento do cérebro facilita a propagação da DAC e que este efeito não é alterado pela desnutrição. Supõe-se que a Gln exerce um papel sobre a excitabilidade cerebral, provavelmente resultante da modulação da síntese de neurotransmissores.

Palavras-chave: Desenvolvimento Cerebral, Depressão Alastrante Cortical, Desnutrição, GABA, Glutamato, Glutamina.

ABSTRACT

The glutamine (Gln) serves as a precursor of the neurotransmitters glutamate and gamma-amino-butyric-acid (GABA). Therefore, the dietary supplementation with Gln is expected to influence the brain excitability. This MS-work originated the paper entitled **L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats**, currently submitted, and which is presented at pages 25 – 48. The aim was to characterize in well-nourished (W) and malnourished (M) weaned rats the effects of previous Gln enteral supplementation during the brain development period, on cortical spreading depression (CSD), an excitability-related brain phenomenon. Male Wistar M- and W-rat pups received Gln (500mg/Kg/day) by gavage during postnatal days 7 to 27. At 30-40 days of life, CSD was recorded during 4h at two points of the parietal cortical surface of the right hemisphere. CSD velocity propagation was calculated from the time required for a CSD-wave to cross the inter-electrode distance. In both nutritional conditions, Gln-treated rats presented higher ($P < 0.05$) CSD propagation velocities (W-Gln, 4.22 ± 0.23 ; M-Gln, 4.51 ± 0.27 mm/min), as compared to vehicle- (water) treated controls (W-Wa, 3.77 ± 0.21 ; M-Wa, 4.15 ± 0.18 mm/min). This water control group did not differ from a naïve (Nv) control group that was not submitted to the gavage procedure (W-Nv, 3.71 ± 0.16 ; M-Nv, 4.10 ± 0.11 mm/min). A fourth group, treated with a “placebo amino acid” (glycine), also displayed CSD-velocities in the control range (W-Gly, 3.59 ± 0.24 ; M-Gly, 4.15 ± 0.18 mm/min). The glutamine supplementation did not alter the body- and brain weights of the animals in any of the nutritional conditions studied. The results indicate that Gln supplementation during brain development facilitates CSD, and that this effect is not altered by malnutrition. Data support the idea of a role for Gln in the brain excitability, probably via neurotransmitters synthesis modulation.

Key words: Brain development, Cortical spreading depression, GABA, Glutamate, Glutamine, Malnutrition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reações da síntese de glutamato e de GABA a partir da glutamina.....	16
Figura 2. Representação esquemática do ciclo glutamina-glutamato/GABA	17
Figura 3. Esquema da Depressão Alastrante Cortical.....	19
Figura 4. Representação esquemática dos grupos estudados	23

Figuras do Artigo

Figura 1. Pesos corporais e encefálicos.....	48
Figura 2. Registros eletrofisiológicos	49
Figura 3. Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical.....	50
Figura 4. Registros eletrofisiológicos apresentando um <i>burst</i> de atividade.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CSD	Cortical spreading depression
D	Desnutrido
DAC	Depressão alastrante cortical
EcoG	Eletrocorticograma
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	Glutamato
Gln	Glutamina /Glutamine
Gly	Glicina/Glycine
I	Ingênuo
i.p.	Intraperitoneal
M	Malnourished
N	Bem-nutrido
Nv	Naïve
SNC	Sistema nervoso central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
V	Veículo
VLV	Varição lenta de voltagem
W	Well-nourished
Wa	Water

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Nutrição, Desnutrição e Sistema Nervoso	13
2.2 Glutamina e Sistema Nervoso	15
2.3 A Depressão Alastrante Cortical	18
3. MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Suplementação com L-glutamina	22
3.3 Pesos corporais e encefálicos	23
3.4 Registro da depressão alastrante cortical	24
3.5 Análise estatística	25
4. RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	65

1. APRESENTAÇÃO

A glutamina (Gln) é um aminoácido considerado condicionalmente essencial, que tem sido amplamente utilizado na prática clínica, por se acreditar que exerça efeitos fundamentais sobre o crescimento, a diferenciação e o fornecimento de energia para células de rápida proliferação, como os enterócitos e as células do sistema imune (HALL et al., 1996). Sua aplicação clínica também tem sido extrapolada para recém-nascidos pré-termos ou de baixo peso ao nascer, com diversos estudos demonstrando os benefícios desta suplementação sobre a sobrevivência, o risco de infecções e o tempo de internação hospitalar (NEU et al., 1997; DALLAS et al., 1998; VAN DEN BERG et al., 2007; KORKMAZ et al., 2007). No entanto, os efeitos da suplementação com Gln sobre o sistema nervoso não tem sido objeto de investigação.

A Gln apresenta funções no sistema nervoso central (SNC), atuando como precursora de neurotransmissores cerebrais e assim influencia a excitabilidade do cérebro (TANI et al., 2007). Por isso, é razoável considerar-se a hipótese de que a suplementação com Gln durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso exerceria efeitos sobre o mesmo e de que tais efeitos poderiam ser modificados pelo estado nutricional. Para testar esta hipótese, utilizamos o modelo da Depressão Alastrante Cortical (DAC), um fenômeno relacionado à excitabilidade cerebral.

Os resultados da presente dissertação estão contidos em um artigo original intitulado *L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats*, o qual foi submetido à publicação (**Anexo A**). Este artigo teve o objetivo de descrever os efeitos da suplementação enteral com L-Gln durante o desenvolvimento cerebral, sobre a DAC, em ratos recém-desmamados, bem-nutridos e previamente desnutridos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Nutrição, Desnutrição e Sistema Nervoso

Através do processo da nutrição os organismos vivos assimilam nutrientes imprescindíveis à realização de suas funções vitais. Uma alimentação equilibrada e que atenda todos os requerimentos do organismo, é necessária para a obtenção de um bom estado nutricional (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005). O estado nutricional adequado, por sua vez, é condição fundamental para o desenvolvimento e a organização do sistema nervoso, estando diretamente relacionado com a produção de energia e de nutrientes necessários ao desenvolvimento de suas estruturas celulares e aos seus diversos processos metabólicos (MORGANE et al., 1993).

A deficiência de nutrientes no organismo caracteriza a desnutrição. Em humanos, sobretudo na infância, constitui um dos maiores problemas de saúde enfrentado por países em desenvolvimento. Apresenta etiologia multifatorial, estando normalmente relacionada ao baixo nível social e econômico (OLIVEIRA et al., 2006). A sua prevalência é bem elevada em algumas regiões da Ásia e da África, exercendo grande impacto sobre as despesas públicas com a saúde (NUBÉ & SONNEVELD, 2005). Na América Latina, a desnutrição é manifestada principalmente como nanismo e deficiência de micronutrientes, a despeito da prevalência decrescente da forma aguda severa ou moderada (WEISSTAUB & ARAYA, 2008). No entanto, a desnutrição aguda ainda resulta em uma alta taxa de letalidade (MÜLLER & KRAWINKEL, 2005).

Vários estudos têm demonstrado as conseqüências da desnutrição infantil sobre o sistema nervoso (UDANI et al., 1992; ODEBODE & ODEBODE, 2005; BENTON, 2008). Além de afetar a maturação deste sistema, a desnutrição promove alterações bioquímicas, fisiológicas e anatômicas no cérebro, podendo causar prejuízos sobre o desenvolvimento cognitivo e comportamental. Esses efeitos deletérios da desnutrição podem persistir por longo-prazo ou tornarem-se permanentes, dependendo do período, da duração, da intensidade e do tipo de desnutrição (MORGANE et al., 1993; GUEDES et al., 1996).

O período da vida em que a desnutrição ocorre é um fator particularmente importante na determinação do impacto que esta terá sobre o sistema nervoso. Dobbing (1968) relatou que existem períodos especificamente “críticos”, no início da vida, onde o organismo parece

estar mais vulnerável aos efeitos da desnutrição. No caso do sistema nervoso, existe apenas um período crítico, logo no início da vida. Nesse período, o peso do cérebro aumenta de maneira extremamente rápida, como resultado dos processos neuroquímicos e neuroanatômicos próprios do seu desenvolvimento. Segundo Morgane et al. (1993), o período crítico refere-se ao pico de atividade de eventos específicos da neurogênese, gliogênese, migração celular e diferenciação celular. Este período de maior vulnerabilidade do cérebro à desnutrição difere entre as espécies de mamíferos. Em humanos, corresponde ao período que vai do terceiro mês de gestação até o segundo ano de vida (DOBBING, 1968). No rato, ocorre durante as três primeiras semanas após o nascimento (MORGANE et al., 1993), coincidindo com o período de aleitamento. É razoável supor que, durante esses períodos de crescimento rápido, as exigências de nutrientes necessários ao desenvolvimento cerebral são maiores. Portanto, a estrutura e a função cerebral estarão comprometidas se a alimentação for inadequada, ocasionando alterações estruturais e déficits funcionais, com prejuízo para vários processos cerebrais (MORGANE et al., 1993; MORGANE et al., 2002).

Um dos efeitos neurais marcantes da desnutrição é a redução do peso encefálico (DOBBING, 1968). Segundo Morgane et al. (1993), as estruturas mais afetadas pela desnutrição durante o desenvolvimento do cérebro são o bulbo olfatório, o hipocampo e o cerebelo.

A natureza do nutriente deficiente determinará o tipo de desnutrição, ou seja, se é uma deficiência de proteínas, de calorias, de vitaminas, de minerais, ou se é uma combinação delas. Os efeitos da desnutrição protéica sobre o SNC são os mais ressaltados na literatura (DÍAZ-CINTRA et al., 1991; ANDRADE et al., 1996; DEBASSIO et al., 1996; VALADARES & ALMEIDA, 2005; KAR et al., 2008), com prejuízos morfológicos e neuroquímicos, uma vez que a proteína fornece aminoácidos essenciais para a síntese de enzimas, de neuropeptídeos, de neurotransmissores cerebrais e de proteínas estruturais. Além da proteína, outros nutrientes isolados, tais como os ácidos graxos essenciais (INNIS, 2008), o ácido fólico, a vitamina B12 (BLACK, 2008) e o iodo (BERBEL et al., 2008) têm também sido estudados, no que concerne ao seu papel sobre o desenvolvimento cerebral.

Diversos modelos experimentais vêm sendo utilizados para se provocar a desnutrição em animais de laboratório. Dentre estes, encontra-se aquele baseado na manipulação do tamanho das ninhadas, método que foi utilizado no presente trabalho. De Lucca et al. (1977), Fernandez et al. (1993) e Rocha-de-Melo et al. (2006) relataram o uso da técnica das grandes ninhadas para impor a desnutrição, baseando-se no aumento do número de filhotes que serão amamentados por uma única mãe. Morgane et al. (1978) admitem que neste caso, a qualidade

do leite é preservada, reduzindo-se a quantidade recebida por cada filhote, levando-os à deficiência nutricional.

A importância de diversos nutrientes sobre o desenvolvimento do cérebro já está bem documentado na literatura. No entanto, muitos questionamentos ainda precisam ser esclarecidos, especificamente acerca dos efeitos da suplementação com determinados aminoácidos, como a glutamina, durante o período de maior vulnerabilidade do desenvolvimento cerebral.

2.2 Glutamina e Sistema Nervoso

A glutamina (Gln) é o aminoácido livre mais abundante no plasma de mamíferos, sendo também encontrado em concentrações relativamente elevadas em muitos tecidos. É um aminoácido fundamental para o crescimento e a diferenciação celular, a transferência de nitrogênio entre os órgãos e o fornecimento de energia para células de rápida proliferação, como os enterócitos e as células do sistema imune (HALL et al., 1996). Além disso, atua como precursora da gliconeogênese hepática, da amoniogênese renal e de neurotransmissores. Também fornece nitrogênio para a síntese de purinas, de pirimidinas e de nucleotídeos (YOUNG & AJAMI, 2001).

Em virtude de sua síntese ocorrer em diversos tecidos, a Gln é considerada como um aminoácido não-essencial. Entretanto, apesar da grande reserva muscular, os estoques endógenos de Gln podem reduzir-se durante insultos catabólicos, como grandes cirurgias, queimaduras extensas, septicemia e inflamação. Assim, em determinadas condições, a demanda metabólica pode exceder a sua capacidade de síntese, sendo necessária a suplementação pela dieta. Devido a esta particularidade, foi classificada como um aminoácido condicionalmente essencial (LACEY & WILMORE, 1990).

Atualmente, vários estudos têm demonstrado os efeitos positivos da suplementação oral/enteral com Gln durante o tratamento de adultos (CHOI et al., 2007) e de crianças hospitalizadas (DUGGAN et al., 2004; VAN DEN BERG et al., 2005). Em uma metanálise realizada por Novak et al. (2002), foi demonstrado que a suplementação com este aminoácido promoveu redução de infecções e do tempo de internação em pacientes cirúrgicos e diminuição da mortalidade em doentes críticos. No tratamento de recém-nascidos hospitalizados, a Gln exógena tem sido associada a menor risco de infecções, melhorias no

crescimento e redução dos custos hospitalares (NEU et al. 1997; DALLAS et al. 1998; VAN DEN BERG et al., 2007; KORKMAZ et al., 2007). No entanto, esses estudos não têm investigado os efeitos desta suplementação sobre parâmetros de neurodesenvolvimento.

No Sistema Nervoso Central (SNC), a concentração de Gln é abundante, sendo superior à de qualquer outro aminoácido no interstício e no fluido cérebro-espinhal (ALBRETCH et al., 2007). Essa concentração no SNC de mamíferos é de 6-11 mM e difere pouco entre as diferentes regiões cerebrais. Acredita-se que em células da glia, onde a Gln é avidamente sintetizada, sua concentração seja maior (ERECINSKA & SILVER, 1990). Esses mesmos autores afirmaram que no líquido céfalo-raquidiano, a concentração de Gln é de 0,5 mM, sendo muito próxima à encontrada no plasma. Por sua vez, a concentração desse aminoácido no espaço extracelular do tecido neural está na ordem de 0,13-0,3 mM. Portanto, a Gln está localizada principalmente no espaço intracelular do cérebro, o que indica que a captação deste aminoácido pelas células neurais ocorre contra um gradiente e deve estar ligado a processos fornecedores de energia.

No SNC, o conteúdo de aminoácidos adquire uma importância que vai além das necessidades de síntese protéica. O fornecimento de aminoácidos é indispensável para a manutenção do conteúdo de neurotransmissores, tanto porque alguns aminoácidos são os próprios neurotransmissores, como porque outros servem como precursores para a síntese dos mesmos (YUDKOFF, 1997). A Gln, por exemplo, atua como precursora do neurotransmissor excitatório glutamato (GLU), que por sua vez é precursor do inibitório, ácido gama-aminobutírico – GABA (BAK et al., 2006) – Figura 1.

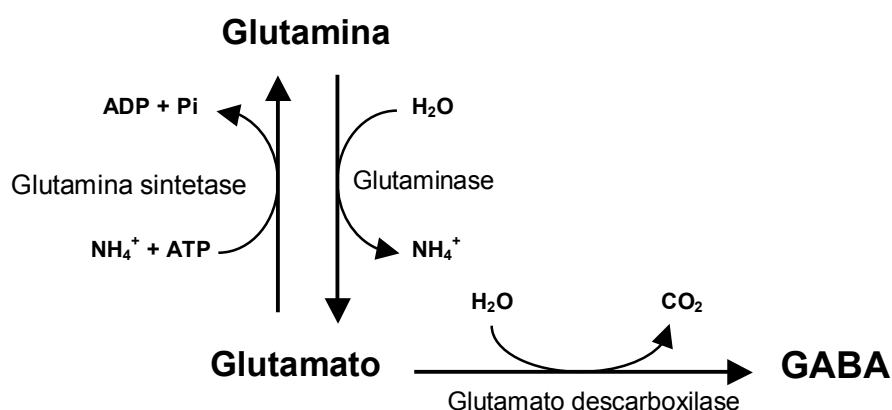


Figura 1. Reações da síntese de glutamato e de GABA a partir da glutamina.

Como o transporte da Gln sangüínea para o cérebro é insuficiente para atender a demanda desse tecido, a sua síntese intra-cerebral ocorre a partir do glutamato (GLU) por meio da enzima glutamina-sintetase (GS), presente nos astrócitos. A maior parte da Gln derivada dos astrócitos é captada pelos neurônios, onde é degradada pela enzima glutaminase, originando o GLU. Este é liberado pelos neurônios, recaptado pelos astrócitos e reconvertido a Gln, fechando o “ciclo glutamina-glutamato” (BRÖER & BROOKERS, 2001; ALBRETCH et al., 2007). Uma porção da Gln disponível no cérebro serve como metabólito energético e outra segue para o sangue através de carreadores específicos. O GLU, por sua vez, atua como precursor do GABA, através de uma reação catalizada pela enzima neuronal ácido glutâmico descarboxilase – GAD (BAK et al., 2006). Na figura 2 encontra-se a representação esquemática do “ciclo glutamina-glutamato/GABA”.

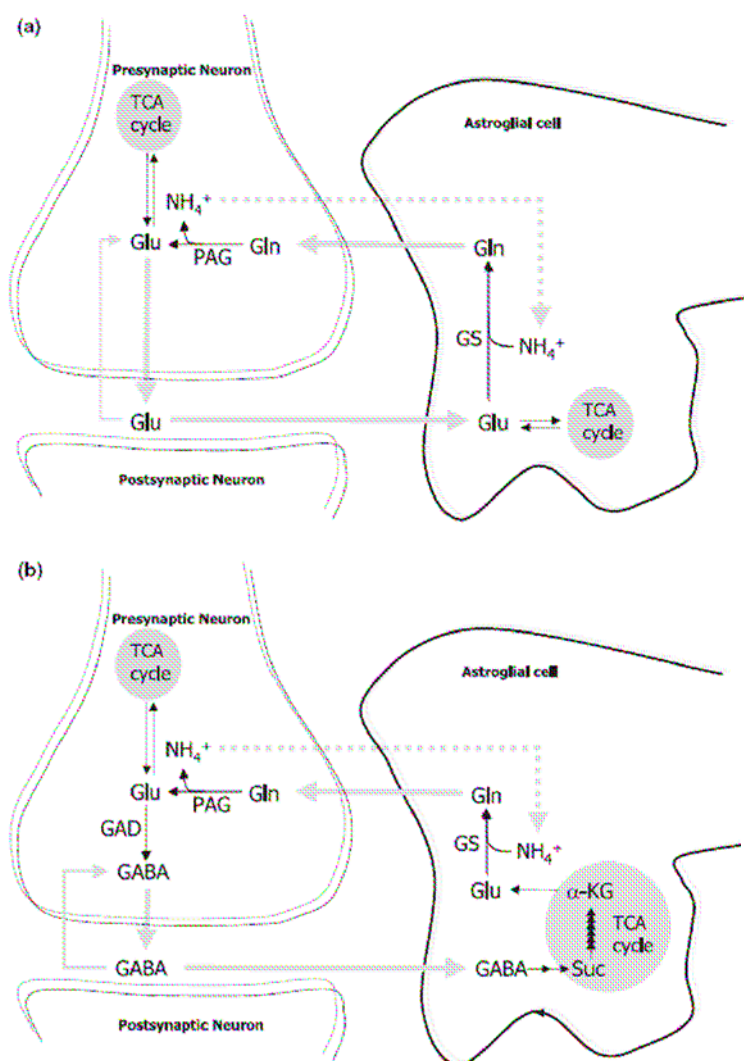


Figura 2. Representação esquemática do ciclo glutamina-glutamato (a) e glutamina-GABA (b) (BAK et al, 2006).

O excesso de Gln pode ser tóxico para o cérebro, o que pode comprometer a função neural (COOPER, 2001; ALBRETCH et al., 2007). Assim, a barreira hemato-encefálica está organizada para atenuar a entrada de Gln sanguínea no cérebro. Ela atua também para eliminar do cérebro o excesso de certos compostos ricos em nitrogênio, como a Gln. Esse efluxo de Gln do cérebro para o sangue constitui um dos mais importantes mecanismos para a excreção do excesso de amônia cerebral (BAK et al. 2006), uma vez que o ciclo da uréia inexistente no cérebro.

A administração enteral de Gln pode resultar em um aumento dos níveis plasmáticos (ROGERO et al., 2004) e cerebrais deste aminoácido. No cérebro, um estudo realizado em ratos mostrou que a elevação da Gln circulante, obtida por suplementação enteral, resultou no aumento das concentrações de GABA e de Gln no tecido estriatal e no fluido extracelular, sem alterações significativas nos níveis de GLU (WANG et al., 2007).

Inúmeros autores procuraram mostrar o potencial efeito anabólico da Gln, bem como possíveis aplicações clínicas de sua suplementação como terapia nutricional. No entanto, poucos trabalhos têm sido dedicados ao estudo do papel fisiológico da Gln no desenvolvimento neural e na modulação da excitabilidade cerebral. Para estudos sobre excitabilidade cerebral, a depressão alastrante cortical (DAC) tem sido utilizada pelo nosso laboratório, como modelo eletrofisiológico, com resultados muito interessantes (GUEDES, 2005). Recentemente, estudos eletrofisiológicos de outros autores sugeriram uma possível relação entre os teores de Gln e a DAC (TANI et al., 2007; AN et al., 2008). A seguir, será descrito o fenômeno da DAC, que foi empregado nesta dissertação.

2.3. A Depressão Alastrante Cortical

A DAC foi inicialmente descrita por Leão (1944), durante estudos sobre epilepsia experimental, nos quais se registrava a atividade elétrica cortical de coelhos anestesiados. A DAC consiste em uma resposta reversível do tecido cortical, provocada por estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto deste tecido. É caracterizada por uma diminuição acentuada da atividade elétrica espontânea ou evocada, a qual se propaga concentricamente a partir do ponto estimulado numa velocidade de 2 a 5 mm/min. Em seguida, o local inicialmente deprimido começa a se recuperar e em torno de 10 a 15 minutos o tecido

encontra-se completamente recuperado (LEÃO, 1972; MARTINS-FERREIRA, 1983). É, portanto, um fenômeno absolutamente reversível (Figura 3).

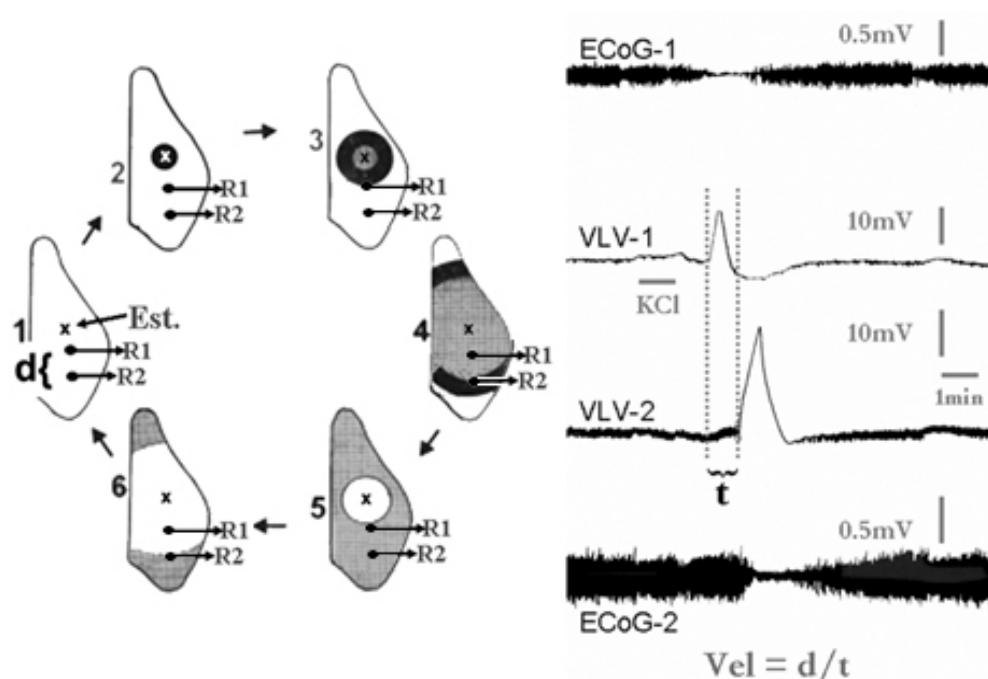


Figura 3. À esquerda, esquema (adaptado de MARTINS-FERREIRA, 1954) mostrando a seqüência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC). Na etapa 1, um ponto cortical (x) foi estimulado (Est.), iniciando a DAC. Dois pontos de registro (R1 e R2) são igualmente mostrados nesta e em todas as outras etapas. A propagação concêntrica da DAC está ilustrada nas etapas 2 a 4, nas quais as áreas escuras representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas indicam regiões que já sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). Nas etapas 5 e 6, observa-se que a recuperação (áreas claras) também se dá de forma concêntrica, sendo o ponto onde a DAC se originou o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente, todo o tecido se recupera, retornando à condição inicial (etapa 1). À direita, mostram-se o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV), a qual sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. Esses eventos foram registrados simultaneamente nos pontos R1 e R2. Neste exemplo, a depressão do ECoG recupera-se totalmente após cerca de 3 minutos (registros obtidos em nosso laboratório).

A depressão alastrante já foi observada em peixes (HIGASHIDA et al., 1977), anfíbios, aves e mamíferos (BURES et al., 1974; MARTINS-FERREIRA et al., 1974; GUEDES et al., 2005), incluindo o homem (MAYEVSKY et al., 1996; GORJI & SPECKMANN, 2004; BERGER et al., 2008). Ela não se limita ao córtex, mas também pode ser observada em outras estruturas extra e subcorticais (LEÃO, 1972; BURES et al., 1974; DO CARMO & MARTINS-FERREIRA, 1984; GUEDES et al., 2005).

Várias hipóteses e evidências clínicas têm sugerido o envolvimento da DAC com algumas neuropatologias humanas, como a epilepsia (LEÃO, 1944; LEÃO, 1972; GUEDES

& CAVALHEIRO, 1997), a enxaqueca com aura (RICHTER & LEHMENKÜHLER, 2008), doenças cerebrovasculares, traumatismo craniano e amnésia transitória global (GORJI, 2001).

A susceptibilidade cortical ao fenômeno parece ser influenciada pelas condições em que se encontra o tecido cerebral. O córtex pode tornar-se mais vulnerável à DA, situação em que o fenômeno se propaga com velocidades mais altas, ou mais resistente, apresentando velocidades mais baixas. Determinadas condições de importância clínica podem alterar essa susceptibilidade ao fenômeno. A desnutrição (GUEDES et al., 1987; ANDRADE et al., 1990; ROCHA-DE-MELO & GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO et al., 2006), a diminuição da concentração extracelular de cloreto (GUEDES & DO CARMO, 1980), a privação do sono paradoxal (VASCONCELOS et al., 2004; GUEDES & VASCONCELOS, 2008), o consumo de etanol (GUEDES & FRADE, 1993; ABADIE-GUEDES et al., 2008), o tratamento com agonistas do GABA (GUEDES et al., 1992), a hipoglicemia (XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ & GUEDES, 2001); o hipertireoidismo (SANTOS, 2000) e a privação sensorial (SANTOS-MONTEIRO, 2002) aumentam a velocidade da DAC.

Por outro lado, o envelhecimento (GUEDES et al., 1996), o tratamento dietético com lítio (GUEDES et al., 1989), a facilitação da atividade serotoninérgica (CABRAL-FILHO et al., 1995; GUEDES et al., 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006), o uso de anestésicos (GUEDES & BARRETO, 1992), o hipotireoidismo (GUEDES & PEREIRA-DA-SILVA, 1993), a hiperglicemia (XIMENES-DA-SILVA & GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ & GUEDES, 2001; COSTA-CRUZ et al., 2006), a epilepsia crônica provocada pela pilocarpina (GUEDES & CAVALHEIRO, 1997; COSTA-CRUZ et al., 2006), a estimulação ambiental (SANTOS-MONTEIRO et al., 2000) e a estimulação elétrica periférica (DO MONTE-SILVA et al., 2007) diminuem a velocidade de propagação da DAC.

A desnutrição modifica a ação de certas substâncias sobre a DAC, o que já foi demonstrado com o diazepam (GUEDES et al., 1992), a glicose (XIMENES-SILVA & GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ & GUEDES, 2001) e a L-arginina (FRAZÃO et al., 2008).

Poucos estudos foram direcionados a demonstrar a relação entre a Gln e a DAC e seus resultados são controversos. Inicialmente, a aplicação tópica de Gln elicitou a DAC em ratos e em coelhos (BURES et al., 1960; VAN HARREVELD, 1959), mas um outro estudo realizado posteriormente demonstrou que a Gln não possuía tal efeito (DO CARMO & LEÃO, 1972). Subseqüentemente, outros autores relataram que na região em que a Gln havia sido aplicada topicamente, a amplitude da variação lenta de voltagem e mudanças na impedância de uma DAC evocada a distância estavam reduzidas (DO CARMO & FERREIRA-FILHO, 1976). Maranhão-Filho & Leão (1991) mostraram que a aplicação tópica de Gln (75 mM) sobre a

superfície dorso-lateral do neocórtex de coelhos tornou o tecido reversivelmente refratário a DAC. Recentemente, Tani et al. (2007) estudando a atividade elétrica em fatias de córtex de ratos observaram que a adição de concentrações supra-fisiológicas (2-5mM) de Gln ao perfusato induziu eventos semelhantes à DAC. Confirmando este achado, An et al. (2008) investigou os efeitos eletrofisiológicos da adição de diferentes concentrações de Gln na composição do fluido cérebro-espinhal artificial (0,5mM e 2-5mM) e demonstrou o surgimento de episódios de DAC quando a concentração de Gln foi maior (2-5mM).

Conforme descrito acima, os estudos que mencionam a relação entre Gln e DAC são escassos e se limitam ao uso tópico ou *in vitro* deste aminoácido. Portanto, este trabalho será o primeiro a investigar *in vivo* os efeitos da suplementação enteral crônica com Gln sobre a DAC durante o período de desenvolvimento do cérebro, bem como avaliar se tais efeitos são afetados pela desnutrição.

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Foram estudados ratos machos, lactentes, da linhagem Wistar (n=81), oriundos da Colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Estes animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em ambiente com condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro de 12/12 horas; fase clara com início às 7:00 h) e temperatura em torno de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os procedimentos descritos para o manejo e o cuidado dos animais cumpriram as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, sendo os experimentos iniciados após a aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 004628/2007-81 – **Anexo B**).

De acordo com o estado nutricional, os animais foram divididos em dois grupos: bem-nutridos e desnutridos (N e D, respectivamente). O primeiro grupo foi constituído por animais mantidos em ninhadas com 6 filhotes durante todo o período de lactação (0 – 25 dias de vida), enquanto o grupo desnutrido foi formado por animais mantidos em ninhadas com 12 filhotes durante este mesmo período. Após o desmame, os animais dos dois grupos foram alimentados com a dieta padrão “Labina” (Purina do Brasil Ltda), a mesma que foi oferecida à mãe. A composição nutricional desta dieta encontra-se no **Anexo C**.

3.2 Suplementação com L-glutamina

Do 7º ao 27º dia de vida pós-natal, os animais foram tratados por gavagem com uma solução contendo 500 mg/Kg de peso corporal/dia de L-glutamina (grupo Gln: N-Gln = 10 ratos e M-Gln = 12 ratos) ou com um volume equivalente de água destilada, ou seja, o veículo que foi utilizado para dissolver a Gln (N-V = 10 e D-V = 10). Duas condições controles adicionais consistiram em (1) gavagem com L-glicina (Gly, 500 mg/Kg/dia: N-Gly = 9 e M-Gly = 10), como controle do nitrogênio oferecido e (2) ausência de gavagem: animais que não receberam tratamento (grupo ingênuo: N-I = 10 e D-I = 10), os quais serviram como controle

do estresse do procedimento de gavagem. Na figura 4 encontra-se a representação esquemática dos oito grupos estudados, resultantes da combinação das duas condições de lactação e dos quatro tratamentos acima mencionados.

O procedimento de gavagem foi realizado sempre no mesmo horário do dia, entre 12 e 14 horas. Durante os 10 primeiros dias de tratamento, a gavagem foi realizada através de uma cânula de polietileno, flexível e de pequeno calibre conectada a uma seringa de vidro de 1,0 ml. Nos dias seguintes, este procedimento foi feito através uma cânula de metal. Antes da introdução da cânula na cavidade oral do animal, a mesma foi demarcada para que atingisse a porção inferior da cavidade gástrica. Em seguida, com o animal contido, a cânula foi introduzida e o líquido injetado lentamente no estômago do animal.

A L-Gln foi obtida do laboratório Sigma e a L-Gly do laboratório Merck. Os aminoácidos foram pesados em balança analítica (Bosch, Modelo S-2000, capacidade de 200g e sensibilidade de 0,1mg) e dissolvidos em água destilada imediatamente antes da administração. O volume das soluções de aminoácidos ou da água destilada foi de 0,5 ml (do 7º ao 13º dia de vida ou 1ª semana de tratamento) e de 1.0 ml/d (do 14º ao 27º dia de vida ou 2ª e 3ª semanas de tratamento).

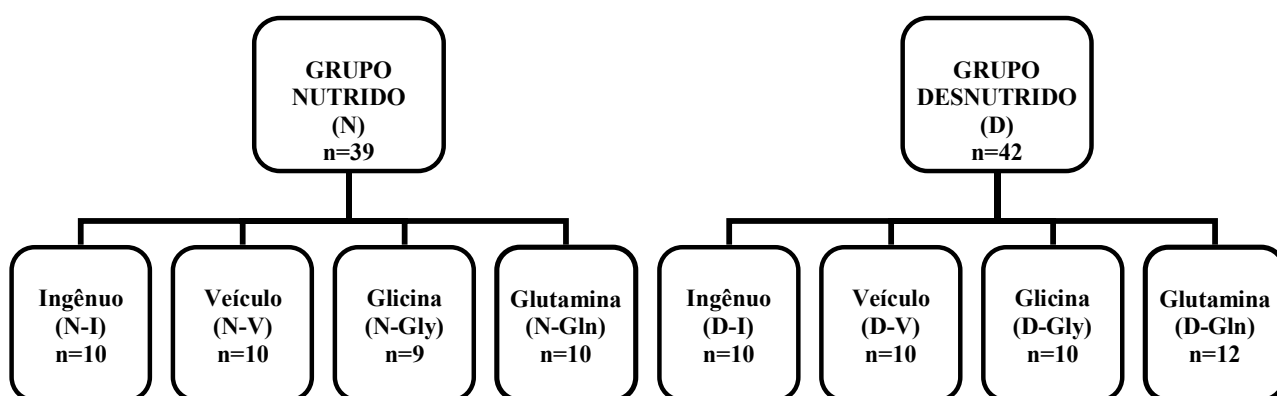


Figura 4. Representação esquemática dos grupos estudados

3.3 Pesos corporais e encefálicos

A evolução ponderal dos animais foi obtida através de uma balança eletrônica da marca Filizola (capacidade de 3,0 Kg e escala em divisão de 0,5g) aos 7, 14, 21 e 35 dias de vida e o peso de cada animal registrado em protocolo individual.

No término de cada sessão de registro, os animais tiveram seus encéfalos (incluindo o cerebelo e excluindo-se o bulbo olfatório) removidos e pesados (peso encefálico úmido). Em seguida, estes encéfalos foram colocados para secar em uma estufa a aproximadamente 100°C e pesados diariamente até atingirem um peso constante, denominado peso encefálico seco. Estes encéfalos foram pesados em balança analítica da marca Bosch, Modelo S-2000, capacidade de 200g e sensibilidade de 0,1mg.

3.4 Registro da Depressão Alastrante Cortical

Entre o 30° e o 40° dia de vida, cada animal foi anestesiado com uma mistura de 1000 mg/Kg de uretana + 40 mg/Kg de cloralose (i.p.). Em seguida, submetido a uma traqueostomia, com introdução de uma cânula de polietileno e mantido sobre um aquecedor elétrico durante todo o período de registro, o que permitiu que a temperatura retal se mantivesse em torno de $37 \pm 1^\circ \text{C}$. A cabeça do animal foi fixada em aparelho esterotáxico, a fim de permitir a exposição do crânio através da remoção da pele. No lado direito do crânio foram trepanados três orifícios de 2-3 mm de diâmetro, sendo dois na região parietal e um na região frontal. Todos foram alinhados paralelamente à linha média.

O registro da DAC foi realizado nos dois pontos da região parietal durante 4 horas através de um polígrafo MODELO 7D (Grass Medical Instruments). A DAC foi provocada a cada 20 minutos por estimulação química no orifício frontal, sendo utilizada para isto uma solução de cloreto de potássio (KCl) a 2% (aproximadamente 270mM), aplicada durante 1 min. O cálculo da velocidade de propagação da DAC foi realizado com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto para a DAC percorrer essa distância. A cada hora de registro, a velocidade média de propagação do fenômeno foi calculada, a partir das DAC's deflagradas em cada hora. Ao final do registro, os animais, ainda anestesiados, foram submetidos à eutanásia por lesão bulbar, realizada pela introdução de uma fina agulha através da cisterna magna, com subsequente parada cardio-respiratória.

3.5 Análise estatística

As comparações inter-grupos foram realizadas utilizando-se a ANOVA, seguida, quando indicado, pelo teste de Tukey-Kramer. Foram aceitas como significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL

L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats

Artigo submetido para publicação na Revista Life Sciences



Title:

L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats

Authors:

Denise Sandrelly Cavalcanti de Lima, Luciana Maria Silva de Seixas Maia, E'lida de Andrade Barboza, Raísa de Almeida Duarte, Laís Santos de Souza, Rubem Carlos Araújo Guedes^{CA}.

Affiliation:

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

^{CA}(Corresponding author): Prof. Rubem C.A. Guedes; address as above

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

Abstract

Aims: Glutamine (GLN) participates in the so-called “brain glutamine-glutamate cycle” and therefore it is likely to influence brain excitability. Here we investigated, in weaned well-nourished and early-malnourished rats, the effects of previous GLN oral supplementation, during the brain development period, on cortical spreading depression (CSD), an excitability-related brain phenomenon.

Main methods: Male Wistar suckling rat pups, well-nourished (W; litters with 6 pups) and malnourished during lactation (M; by increasing the litters to 12 pups), received Gln (500mg/Kg/day) by gavage during postnatal days 7 to 27. At 30-40 days of life, they were submitted to a cortical spreading depression (CSD) recording session during 4h, on 2 cortical parietal points of the right hemisphere. CSD velocity propagation was calculated from the time required for a CSD-wave to cross the inter-electrode distance.

Key findings: In both nutritional condition, Gln rats presented higher ($P < 0.05$) CSD propagation velocities (W-Gln, 4.22 ± 0.23 ; M-Gln, 4.51 ± 0.27 mm/min), as compared to water-treated controls (W-Wa, 3.77 ± 0.21 ; M-Wa, 4.15 ± 0.18 mm/min). This water control group did not differ from a naïve control group that was not submitted to the gavage procedure. A fourth group, treated with a “placebo amino acid” (glycine), also displayed CSD-velocities in the control range.

Significance: The results indicate that Gln supplementation during brain development facilitates cortical spreading depression propagation, as judged by the higher CSD-velocities, and this effect is not abolished by malnutrition. Data support the idea of Gln-related changes in brain excitability, during neural development.

Key words: Brain development, Cortical spreading depression, Glutamine, Malnutrition.

Introduction

Glutamine (Gln) is the most abundant amino acid in the extracellular space of the organism (Ennis et al. 1998). This includes the cerebrospinal fluid and the brain tissue, where concentrations are at least one order of magnitude higher than those of any other amino acid (Albretch et al. 2007). Gln has been classified as a “conditionally essential amino acid” (Lacey and Wilmore 1990), because under certain conditions, such as major surgery, extensive burns, sepsis and inflammation, the metabolic demand may exceed the capacity of synthesis, and thus Gln must be supplemented.

In hospitalized newborns, enteral Gln has been associated to reduction of infectious morbidity, growth improvement and reduction of hospital costs (Van den Berg et al. 2007; Korkmaz et al. 2007; Dallas et al. 1998). However, the effects of this supplementation on neural development and excitability modulation have not been object of much investigation. In the “brain glutamate-glutamine cycle”, astrocytes convert glutamate released by neurons to glutamine and release it into the extracellular space. The extracellular glutamine is then taken up by neurons and is converted back into glutamate or into gamma-aminobutyric acid (GABA; Bröer and Brookes 2001; Patel et al. 2001; Albretch et al. 2007). This cycle can in all probability be influenced by exogenous Gln administration, which could modulate the neuronal excitability (Tani et al. 2007).

In order to investigate the possibility of neuronal excitability modulation by Gln, we analyzed, in the rat, the electrophysiological effects of Gln enteral supplementation on the propagation of the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). CSD is a fully reversible, excitability-related neural response first described in the rabbit cortex as a slowly propagating wave of depression of spontaneous neuronal activity produced by electrical, mechanical or chemical stimulation of one point on brain tissue, from which it spreads

concentrically to remote cortical regions, (Leão 1944). CSD has already been demonstrated in the human brain (Dohmen et al. 2008). The recovery process is completed 5–10 min thereafter, rendering again the brain tissue prone to another CSD.

Measuring CSD velocity of propagation along the cortical tissue is a reasonable and easy way of estimating the brain CSD susceptibility. This has been experimentally characterized in our laboratory under conditions of environmental, pharmacological, and nutritional manipulations (Abadie-Guedes et al. 2008; Fregni et al. 2007; Amâncio-dos-Santos et al. 2006; Costa-Cruz et al. 2006). Concerning the nutritional factors, it has been well established that conditions like early malnutrition (De Luca et al. 1977; Rocha-De-Melo et al. 2006), as well as enteral administration of the amino acid L-Arginine (Frazão et al. 2008) increase CSD propagation, but no information is available regarding systemic Gln effects on CSD *in vivo*.

By using electrophysiological recording of CSD, two questions in the brain of weaned young rats, subjected to malnutrition during lactation followed by nutritional recovery, have been presently addressed: (1) How does daily enteral administration of Gln during the brain development affects CSD propagation, and (2) if so, how would this effect be influenced by the previous brain nutritional condition.

Materials and Methods

Animals

The Wistar rat pups of this study (n = 81; males only) were handled in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, USA) and with the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco. They were maintained in polyethylene cages (51 cm×35.5 cm×18.5 cm) in a

room maintained at $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12:12h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). These pups were divided in two groups, according to the nutritional status consequent to the lactation conditions: well-nourished and malnourished (respectively W- and M-group). The W-group originated from litters with six pups whereas in the M-condition the litters were larger, formed by twelve pups during the entire lactation (0-25 days of life), as described previously (Rochade-Melo et al. 2006). Under this condition of increased demand for the dam's milk, the pups suffer a moderate degree of malnutrition during the lactation period. After weaning, both groups were switched to the maternal lab chow diet (Purina do Brasil Ltda.), with 23% protein.

L-Glutamine treatment

From the 7th to the 27th postnatal day, the pups were treated by gavage with 500mg/Kg/day of L-glutamine solution (Gln; 10 W- and 12M-rats) or with an equivalent volume (see below) of distilled water (Wa; 10 W- and 10 M-rats). Two additional control conditions consisted in (1) the treatment with L-glycine (Gly; 500 mg/Kg/d; 9W- and 10M rats), as control for the nitrogen offered with the L-glutamine treatment, and (2) no treatment (gavage-free or "naïve" - Nv; 10W- and 10 M-rats), as control for the stress of the gavage procedure. The L-glutamine was obtained from the Sigma laboratory and L-glycine from the Merck laboratory. Both amino acids were dissolved in distilled water immediately before the administration. The gavage volume of the amino acid solutions or of distilled water ranged from 0.5 ml/d (in the second week of life) to 1.0 ml/d (in the third and fourth week of life).

Body and brain weights

The body weights were measured at postnatal days 7, 14, 21 and 35.

At the end of the recording session, the animals had their brains (including the cerebella and excluding the olfactory bulbs) removed and weighed (wet brain weight). Brains were then kept in an oven at 100°C and weighed daily until they reached a constant weight (dry brain weight).

CSD Recording

On the day of CSD recording (30-40 days of life), the rats were anesthetized by i.p. injecting a mixture of 1,000 mg/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose (Sigma; 10ml/kg) and three trephine holes were drilled on the right side of the skull. These holes were aligned in the fronto-occipital direction and parallel to the midline. CSD was elicited at 20 min intervals by 1 min application of a cotton ball (1–2 mm diameter), soaked in 2% KCl solution, to the anterior hole (2 mm in diameter) drilled at the frontal region. The two other holes (2–3 mm in diameter) on the parieto-occipital region served as recording places. Both the cortical spontaneous electrical activity (electrocorticogram; ECoG) and the slow potential change accompanying CSD were continuously recorded for 4 h, by means of two Ag–AgCl agar-Ringer electrodes (one in each hole), against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bone. The CSD velocity of propagation was calculated from the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical recording points. The number of CSDs elicited by each KCl application, amplitudes of the CSD-related slow potential shifts, rise and recovery times and the durations of the CSDs were also evaluated. During the recording period, rectal temperature was maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by means of a heating blanket. The CSD was recorded by a polygraph MODEL 7D (Grass Medical Instruments). At the end of the recording session, the still anesthetized animals were subjected to euthanasia by bulbar injury (provoked by introducing a sharp needle into the cisterna magna), with subsequent cardio-respiratory arrest.

Statistics

Inter-group weight- and CSD-differences were compared by using an ANOVA, including as factors: nutritional status (W and M), and gavage treatment (Nv, Wa, Gly and Gln) followed by a post-hoc test (Tukey) when indicated. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

Results

Body and brain weights

As shown in Fig. 1, animals of the M-groups presented lower ($P < 0.05$) body and brain weights, as compared with those of the W-groups. M-rats at 7th, 14th, 21st and 35th day of life weighed on average 17.3, 28.4, 28.7 and 28.4% less than W-rats at the corresponding ages, irrespective of the gavage treatment.

The brain weights in the M-rats were 10% (wet) and 15.7% (dry) less than W-rats.

A one-way ANOVA showed that the main effect of nutrition condition was significant for the body weights at 7 days ($F[7, 81]=6.351$; $p < 0.001$), at 14 days ($F=[7, 81]=17.653$, $p < 0.001$) 21 days ($F[7, 81]=17.531$; $p < 0.001$) and 35 days ($F[7, 55]=15.687$; $p < 0.001$). The main effect of nutrition condition was also seen on the wet-brain weights ($F[7, 61]= 15.134$; $p < 0.001$) and on the dry-brain weights ($F[7,53]=23.298$; $p < 0.001$).

The Gln supplementation did not affect body- and brain weights in neither of the nutritional conditions.

CSD velocities

In all groups, topical application of 2% KCl for 1min at the frontal cortex elicited, as a rule, a single CSD wave, which was recorded by the two electrodes located more posteriorly in the stimulated hemisphere. In rare occasions (usually once per rat), after a KCl stimulation two CSD episodes appeared, instead of one. In the W-groups, this was seen in 3 Nv, 5 Wa, 4 Gly and 6 Gln rats. In the M-group, 2 Nv, 3 Wa, 2 Gly and 5 Gln rats. Although this has occurred in a slightly higher number of Gln-treated animals, no intergroup differences were found. Electrophysiological recordings, on the cortical surface of two well-nourished and two malnourished animals, showing the ECoG depression and the slow potential change accompanying CSD are presented in Fig. 2. Both the ECoG and slow potential recordings confirmed the presence of CSD after each KCl-stimulation.

Concerning CSD velocity of propagation, ANOVA revealed a main effect of the nutrition condition ($F[1, 80]=121.08$; $p<0.001$). A post-hoc (Tukey) test indicated that CSD the velocities were higher in the malnourished rats, as compared to the corresponding well-nourished controls. A main effect of the gavage condition was also detected ($F[4, 80]=35.239$; $p<0.001$). The Tukey test revealed that the treatment with Gln significantly increased the CSD propagation velocities, as compared with the three control groups (Nv, Wa and Gly) and this effect was independent of the nutrition condition.

In the rats treated with Gln, the CSD propagation velocities in both W- and M nutritional conditions were respectively 4.22 ± 0.23 (W-Gln) and 4.51 ± 0.27 mm/min (M-Gln), while in the water-treated controls the mean velocities were 3.77 ± 0.21 (W-Wa) and 4.15 ± 0.18 mm/min (M-Wa). These Wa control groups did not differ from the Nv control groups (W-Nv, 3.71 ± 0.16 ; M-Nv, 4.10 ± 0.11 mm/min), or from the fourth control group treated with Gly (W-Gly, 3.59 ± 0.24 ; M-Gly, 4.15 ± 0.18 mm/min). The CSD velocities for all groups are shown in Fig. 3.

The amplitudes of the CSD slow potential shifts, as well as their duration and rise- and recovery times, did not present intergroup significant differences (Table 1).

In some experiments, the appearance of a burst of high-amplitude ECoG waves was detected (Figure 4). These burst appeared just before the invasion of the recording cortical region by CSD. No intergroup difference could be found, concerning the number of rats presenting such bursts, neither regarding their duration, although a non-significant tendency to longer bursts was found in the Gln-treated rats (Table 2).

Discussion

In this study we were able to electrophysiologically identify in rats neural activity changes produced in vivo by Gln supplementation during the critical period of the nervous system development. Data demonstrated that during this period the Gln enteral supplementation facilitated CSD propagation in both well-nourished and malnourished conditions, as indicated by the higher CSD velocities. It is suggested that early Gln supplementation led to central nervous system developmental alterations that are involved, at least in part, in the here described facilitation of CSD propagation.

The Gln is the major precursor of neuronal glutamate, which is the main mediator of excitatory signals in the central nervous system of mammals (Erecinska and Silver 1990). By using glutamate as substrate, the neuronal enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) can catalyze the formation of GABA (Patel et al. 2001). Therefore, one can conclude that in the brain both glutamatergic and GABAergic neurons rely on Gln from astrocytes to maintain neurotransmitter homeostasis (Bak et al. 2006). Although in this study amino acid blood levels have not been monitored, it is reasonable to assume that the present long term Gln

treatment might in all probability have caused an amino acid imbalance (Jessop 1997), due to the increase of Gln blood levels (Rogerio et al. 2004), which has been shown by others to be associated to elevated brain Gln and GABA (Wang et al. 2007). The assumed causal link between Gln treatment and the here described CSD changes cannot be attributed to the gavage stress since the control groups, treated with distilled water, have been equally submitted to the same procedure and did not present those CSD alterations. In addition, the “naïve” groups, which were not submitted to the gavage, presented CSD features similar to the water-treated controls. Moreover, in order to test the possibility that the effects are due to a non-specific amino acid imbalance (i.e., a Gln-independent effect), two additional groups (one in the W- and the other in the M-condition) were treated in the same manner with equivalent amounts of L-glycine, which, in contrast to Gln, has no participation in glutamate/GABA synthesis. These additional control groups also displayed CSD propagation velocities comparable to the water-treated groups. Thus, it is reasonable to postulate that the increase in plasma Gln would lead to an increase in the brain interstitial content of this amino acid, supporting a role for excessive Gln in modifying the neuronal excitability, probably via modulation of the glutamate /GABA–glutamine cycle between neurons and astrocytes (Patel et al. 2001). On the other hand, excessive Gln can be toxic for the brain, and this may impair neuronal function (Cooper 2001; Albrecht et al. 2007). Thereby, the blood-brain barrier (BBB) is organized to attenuate the entry of Gln in the brain, as well as to eliminate brain nitrogen-rich compounds like ammonia and certain amino acids, including Gln. In this way, BBB participates in the regulation of nitrogen metabolism of the tissue and protects it against neurotoxicity caused by such nitrogen-rich molecules (Lee et al 1998). The efflux of Gln from brain to blood constitutes the most important mechanism for excreting the brain excess of ammonia (Bak et al. 2006). Although we have not measured the blood- or brain Gln levels, it is tempting to suppose that, under the conditions of daily Gln intake of the present study, this

amino acid has accumulated in the brain tissue, as it usually does in the blood, as well as in other tissues, such as muscle and liver (Rogero et al. 2004). This amino acid imbalance could lead to either neurotoxicity and/or to modulation of the glutamate and GABA synthesis (Yudkoff et al. 2005). Of note, glutamate- and GABA-mediated mechanisms are important for the phenomenon of CSD (Guedes et al. 1992; Marrannes et al. 1988).

Few studies have so far addressed the relationship between this amino acid and CSD, with controversial results. The topical application of Gln was initially said to be effective in eliciting CSD in rats and in rabbits (Bureš et al. 1960; Van Harreveld 1959), but another study later demonstrated that Gln did not have such effect (Do Carmo and Leão 1972).

Subsequently other authors reported that, in a cortical region to which Gln had been topically applied, the amplitude of the slow potential and impedance changes of a CSD evoked at a distance were decreased (Do Carmo and Ferreira-Filho 1976). Maranhão-Filho and Leão (1991) showed that the topical application of Gln (75mM) to the dorsolateral surface of the neocortex of rabbits renders the tissue reversibly refractory to CSD. Recently, it has been reported that supraphysiological Gln concentrations (2-5mM) in the ACSF elicit CSD in neocortical- (Tani et al. 2007) and in hippocampus slices (An et al. 2008). The present Gln-treatment conditions included a long-term gavage (for 21 days) in a developing organism (lactating rat). As far as we know, this study constitute the first report documenting CSD-effects in vivo, under these conditions, which led us to postulate a long-lasting Gln action on the developing brain.

In this study, malnutrition was confirmed by brain- and body weights, which were significantly lower in the malnourished groups, when compared to their respective well-nourished controls. Since the reduction in body and brain weights is one of the marked effects of early malnutrition (Dobbing 1968), we can conclude that the increase in the number of pups during the lactation period was effective in producing malnutrition. These data confirm

previous studies on malnutrition provoked in the rat by manipulation of the litter size (Rocha de Mello et al. 2006). Such brain weight reduction probably resulted from the decreased number and/or size of cell elements, as well as from alterations in the events that cause neuronal maturation. This implies in reduction of processes like dendritic development, synapse formation and myelination (Morgane et al. 1978; Picanço-Diniz et al. 1998).

The adverse effects of prenatal and early postnatal malnutrition on the developing brain largely depend on the malnutrition timing in relation to various brain developmental events, as well as on the type and severity of the nutritional deprivation (Morgane et al. 1978).

Malnutrition facilitates CSD in the rat brain (De Luca et al. 1977), and this condition has been extensively demonstrated in our laboratory (Guedes et al. 1987; Andrade et al. 1990; Rocha-de-Melo and Guedes 1997; Rocha-de-Melo et al. 2006), and confirmed in the present study, as indexed by the CSD velocities in the naïve condition, which were higher in the malnourished group, as compared to the well-nourished one (see Fig. 3). As previously mentioned, malnutrition early in life impairs gliogenesis and myelin formation and increases brain cell packing density (Morgane et al. 1978). So, compared with the well-nourished brain, the early-malnourished brain is smaller, with smaller cells packed in a denser manner and with a reduced extracellular space volume. In addition, as pointed out by Feoli et al. (2006), malnourished rats present reduced brain glutamate uptake. All these processes have been considered important in determining the CSD propagation features: less myelination would represent a reduction of a structure counteracting the humoral CSD propagation (De Luca et al. 1977); glial cells impairment would also favor CSD propagation (Largo et al. 1997); furthermore, since a larger extracellular space volume should hinder the elicitation and propagation of CSDs (Lehmenkühler et al. 1993a; Richter et al. 2003), the malnourished small brain with a higher cell packing density and a smaller extracellular space volume would favor CSD propagation, as found in the malnourished rats of our work. Finally, Diaz-Cintra et

al. (2007) demonstrated in malnourished rats an increase in the enzyme glutamic acid decarboxylase. This finding, together with the finding of Feoli (2006) of a reduced brain glutamate uptake in malnourished rats, implies in an increase in extracellular glutamate, which also would facilitate CSD propagation.

In the malnourished rat brain, CSD responses to certain substances like diazepam (Guedes et al. 1992), glucose (Ximenes-da-Silva and Guedes 1991; Costa-Cruz and Guedes 2001) and L-arginine (Frazão et al. 2008) are reduced, when compared to those responses of well-nourished animals. In contrast to that, in the present study malnutrition did not alter the facilitating effect of Gln on the CSD, suggesting a high degree of resistance of the metabolic pathways involved in the Gln-dependent CSD effects. A similar “high resistance hypothesis” has also been formulated, concerning the relatively small changes of NADPH-diaphorase containing neurons to the deleterious action of malnutrition (Picanço-Diniz et al. 1998; Borba et al. 2000).

Concerning the relevance of the present data for the human nutrition, some clinical evidence deserves discussion. In the last decade, several studies on the beneficial effects of Gln supplementation in critically ill children (Neu et al. 1997; Thompson et al. 2003; Vaughn et al. 2003) have shown that this supplementation is safe and not causing toxic levels of ammonia and glutamate, or changes suggestive of neurotoxicity (Lacey et al. 1996; Anderson et al. 1998; Thompson et al. 2003). However, in those studies the identification of neural alterations produced by Gln supplementation did not seem to have been properly addressed. Further clinical studies are needed to deeply address this issue.

Conclusion

Our data documented, for the first time, a facilitating effect of enteral Gln supplementation on CSD propagation in the rat, which was not influenced by malnutrition early in life. CSD has been viewed as an excitability-related phenomenon in the brain and has causally been associated to important clinical diseases like migraine with aura and epilepsy (Leão 1944; 1972; Lehmenkühler et al. 1993b; Read and Parsons 2000), and the present data can be considered as novel electrophysiological evidence in favor of Gln effects on the developing brain. The results advance the knowledge on the comprehension of the neural effects of Gln and thus might be useful to shed light on the mechanisms of metabolic processes that are associated with excitability-related neurological diseases such as hepatic encephalopathy, epilepsy and migraine.

Acknowledgments

The authors thank the financial support from the Brazilian National Research Council (CNPq) and from FINEP/IBN-Net.(# 01.06.0842-00) and MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT - no. 17/2006. R.C.A. Guedes is Research fellow of CNPq (# 302565/2007-8).

References

1. Abadie-Guedes R, Santos SD, Cahú TB, Guedes RCA, Bezerra RS. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32(8), 1417-1421, 2008
2. Albrecht J, Sonewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Frontiers in Bioscience* 1(12), 332-343, 2007
3. Amâncio-dos-Santos AA, Pinheiro PCF, Lima DSC, Ozias MG, Batista-de-Oliveira M, Guimarães NX, Guedes RCA. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experimental Neurology* 200, 275-282, 2006
4. An JH, Su Y, Radman T, Bikson M. Effects of glucose and glutamine concentration in the formulation of the artificial cerebrospinal fluid (ACSF). *Brain Research* 1218, 77-86, 2008
5. Anderson PM, Schroeder G, Skubitz KM. Oral glutamine reduces the duration and severity of stomatitis after cytotoxic cancer chemotherapy. *Cancer* 83(7), 1433-1439, 1998
6. Andrade AFD, Guedes RCA, Teodósio NR. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23, 889-893, 1990
7. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry* 98, 641-653, 2006

8. Borba JMC, Araújo MS, Picanço-Diniz C, Manhães-de-Castro R, Guedes RCA. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurones in the rat visual cortex after early malnutrition. *Brain Research Bulletin* 53, 193-201, 2000
9. Bröer S, Brookes N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *Journal of Neurochemistry* 77, 705-719, 2001
10. Bureš J, Burešová O, Krivánek J. Some metabolic aspects of Leão's spreading cortical depression. In: Tower DB, Schadé JP (Eds) *Structure and Function of the Cerebral Cortex*. Elsevier, Amsterdam, pp 257-265, 1960
11. Cooper AJ. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 7(4), 280-286, 2001
12. Costa-Cruz RRG, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RCA. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neuroscience Letters* 401, 271-275, 2006
13. Costa-Cruz RRG, Guedes RCA. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neuroscience Letters* 303, 177-180, 2001
14. Dallas MJ, Bowling D, Roig JC, Auestad N, Neu J. Enteral glutamine supplementation for very-low-birth-weight infants decreases hospital costs. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 22(6), 352-356, 1998
15. De Luca B, Cioffi LA, Bures J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nervosa Superior* 19, 130-131, 1977

16. Dobbing J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davison AN, Dobbing J (Eds) *Applied Neurochemistry*. Blackwell, Oxford, pp 287-316, 1968
17. Do Carmo RJ, Ferreira-Filho CR. Efeitos de glutamato, glutamina e K⁺ na impedância elétrica e voltagem do córtex cerebral na ausência e durante a depressão alastrante. *Ciência e Cultura* 28 (suppl), 466, 1976
18. Do Carmo RJ, Leão AAP. On the relation of glutamic acid and some allied compounds to cortical spreading depression. *Brain Research* 39, 515-518, 1972
19. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R; Co-Operative Study of Brain Injury Depolarisations (COSBID) Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Annals of Neurology* 63:720-728 2008
20. Ennis SR, Kawai N, Ren X-D, Abdelkarim GE, Keep RF. Glutamine uptake at the blood – brain barrier is mediated by N-system transport. *Journal of Neurochemistry* 71, 2565-2573, 1998
21. Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 35, 245-296, 1990
22. Feoli AM, Siqueira I, Almeida LMV, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, Gottfried C, Perry ML, Gonçalves CA. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *Journal of Nutrition* 136, 2357-2361, 2006
23. Frazão MF, Maia LMSS, Guedes RCA. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. *Neuroscience Letters* 447, 26-30, 2008
24. Fregni F, Liebetanz D, Monte-Silva KK, Batista-de-Oliveira M, Santos AA, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Guedes RCA. Effects of transcranial direct

- current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Experimental Neurology* 204, 462-466, 2007
25. Guedes RCA, Andrade AFD, Cabral-Filho JE. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* 20, 639-642, 1987
 26. Guedes RCA, Cabral-Filho JE, Teodósio NR. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. In: Do-Carmo RJ (Ed) *Spreading Depression, Experimental Brain Research Series*, Vol 23. Springer, Berlin, pp17-26, 1992
 27. Jessop NS. Protein metabolism during lactation. *Proceedings of the Nutrition Society* 56, 169-175, 1997
 28. Korkmaz A, Yurdakök M, Yiğit S, Tekinalp G. Long-term enteral glutamine supplementation in very low birth weight infants: effects on growth parameters. *The Turkish Journal of Pediatrics* 49(1), 37-44, 2007
 29. Lacey JM, Wilmore, DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutrition Reviews* 48, 297-309, 1990
 30. Lacey JM, Crouch JB, Benfell K, Ringer SA, Wilmore CK, Maguire D. The effects of glutamine supplemented parenteral nutrition in premature infants. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 20, 74-80, 1996
 31. Largo C, Ibarz JM, Herreras O. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain *in situ*. *Journal of Neurophysiology* 78, 295-307, 1997
 32. Leão A. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology* 7, 359-390, 1944

33. Leão AAP. Spreading depression. In: Purpura DP, Penry K, Tower DB, Woodbury DM, Walter RD (Eds) *Experimental Models of Epilepsy*. Raven Press, New York, pp 173-195, 1972
34. Lee WJ, Hawkins RA, Viña JR, Peterson DR. Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *AJP Cell Physiology* 274, 1101-1107, 1998
35. Lehmenkühler A, Grottemeyer KH, Tegtmeier T. *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment*. Urban and Schwarzenberg, München, 1993
36. Lehmenkühler A, Syková E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* 55(2), 339-351, 1993
37. Marrannes R, Willems R, Prins E, Wauquier A. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Research* 457, 226-240, 1988
38. Maranhão-Filho PA, Leão AAP. A note on the action of glutamine on cortical spreading depression. *Cephalalgia* 11, 201-204, 1991
39. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino JD, Kissane J, Hawrylwicz E, Resnick O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience Behavior Reviews* 2, 137-230, 1978
40. Neu J, Roig JC, Meetze WH, Veerman M, Carter C, Millsaps M, Bowling D, Dallas MJ, Sleasman J, Knight T, Auestad N. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. *Journal of Pediatrics* 131(5), 691-699, 1997

41. Patel AB, Rothman DL, Cline GW, Behar KL. Glutamine is the major precursor for GABA synthesis in rat neocortex *in vivo* following acute GABA-transaminase inhibition. *Brain Research* 919, 207-220, 2001
42. Picanço-Diniz CW, Araújo MS, Borba JMC, Guedes RCA. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon term terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional Neuroscience* 1, 35-48, 1998
43. Read SJ, Parsons AA. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? *Brain Research* 870, 44-53, 2000
44. Richter F, Rupprecht S, Lehmenkühler A, Schaible HG. Spreading depression can be elicited in brain stem of immature but not adult rats. *Journal of Neurophysiol.* 90(4), 2163-2170, 2003
45. Rocha-de-Melo AP, Cavalcanti JB, Barros MAS, Guedes RCA. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutritional Neuroscience* 9(3/4), 155-160, 2006
46. Rocha-de-Melo AP, Guedes RCA. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition within the lactation period. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30, 663-670, 1997
47. Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG, Pires ISSO, Castro IA. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. *Nutrition Research* 24, 261-270, 2004
48. Tani H, Bandrowski AE, Parada I, Wynn M, Huguenard JR, Prince DA, Reimer RJ. Modulation of epileptiform activity by glutamine and system A transport in a model of post-traumatic epilepsy. *Neurobiology of Disease* 25, 230-238, 2007

49. Thompson SW, McClure BG, Tubman TRJ. A randomized, controlled trial of parenteral glutamine in ill, very low birth-weight neonates. *Journal of Pediatric and Gastroenterology and Nutrition* 37(5), 550-553, 2003
50. Van den Berg A, van Zwol A, Moll HA, Fetter WP, van Elburg RM. Glutamine-enriched enteral nutrition in very low-birth-weight infants: effect on the incidence of allergic and infectious diseases in the first year of life. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 161, 1095-1101, 2007
51. Van Harreveld A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *Journal of Neurochemistry* 3, 300-315, 1959
52. Vaughn P, Thomas P, Clark R, Neu J. Enteral glutamine supplementation and morbidity in low birth weight infants. *Journal of Pediatrics* 142(6), 662-668, 2003
53. Wang L, Maher T J, Wurtman R J. Oral L-glutamine increases GABA levels in striatal tissue and extracellular fluid. *The FASEB Journal* 21, 1227-1232, 2007
54. Ximenes-da-Silva A, Guedes RCA. 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(12), 1277-1281, 1991
55. Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Luhovyy B, Lazarow A, Nissim I. Brain Amino Acid Requirements and Toxicity: The Example of Leucine. *Journal of Nutrition* 135, 1531S-1538S, 2005

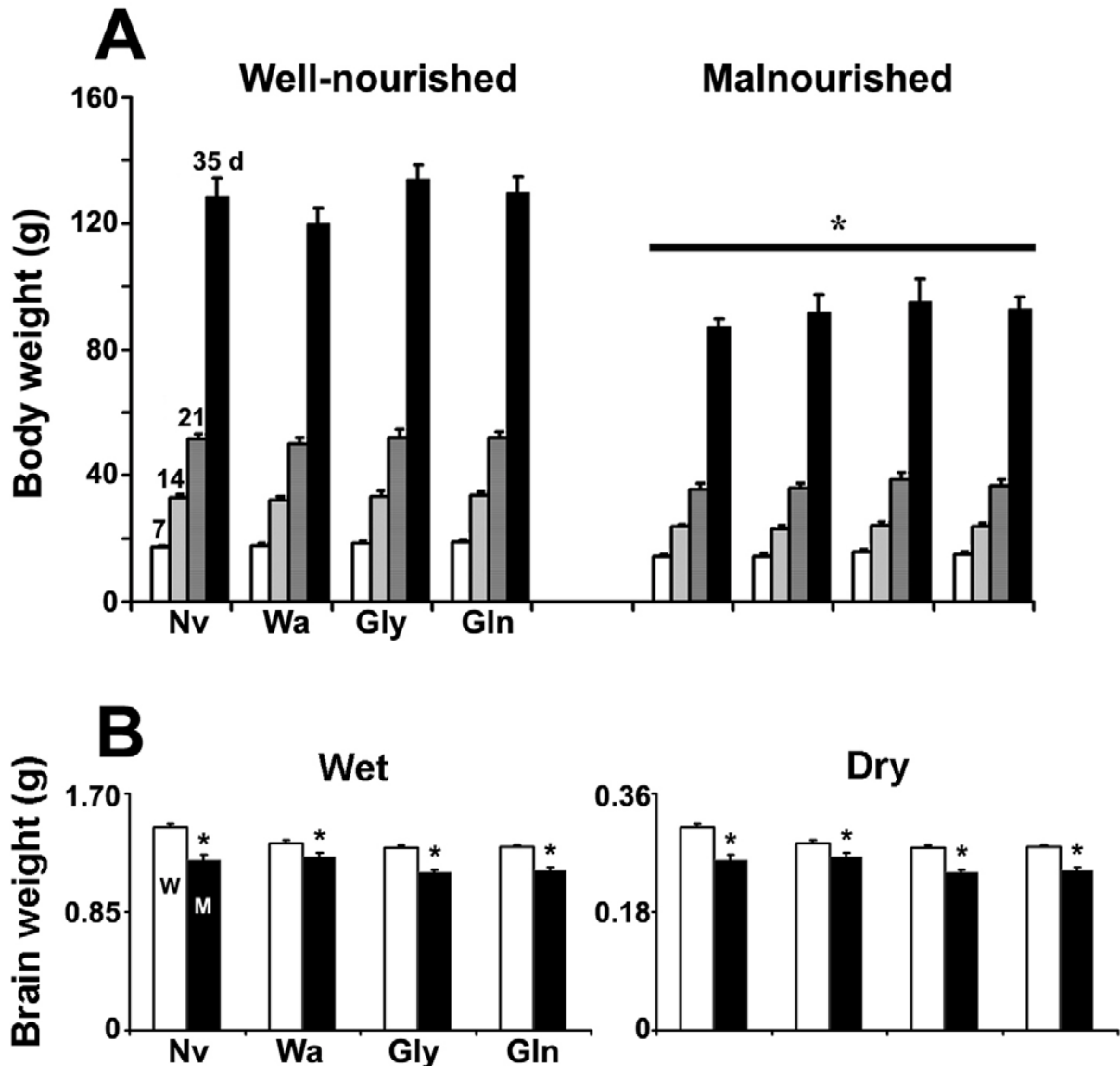


Figure 1 – Body and brain weights (mean \pm s.e.m.; panels A and B, respectively) of well-nourished (W) and malnourished (M) male Wistar rats treated per gavage from postnatal day 7 to 27 with water (Wa), glycine (Gly) or glutamine (Gln). A naïve group (Nv), which was gavage-free, is also included as an additional control. Body weights were measured on days 7, 14, 21 and 35. Brain weights were measured on the day of the recording of cortical spreading depression (30-40 days of life). Asterisks indicate M-values that are significantly different from the corresponding W-groups ($P < 0.05$; ANOVA plus Tukey test).

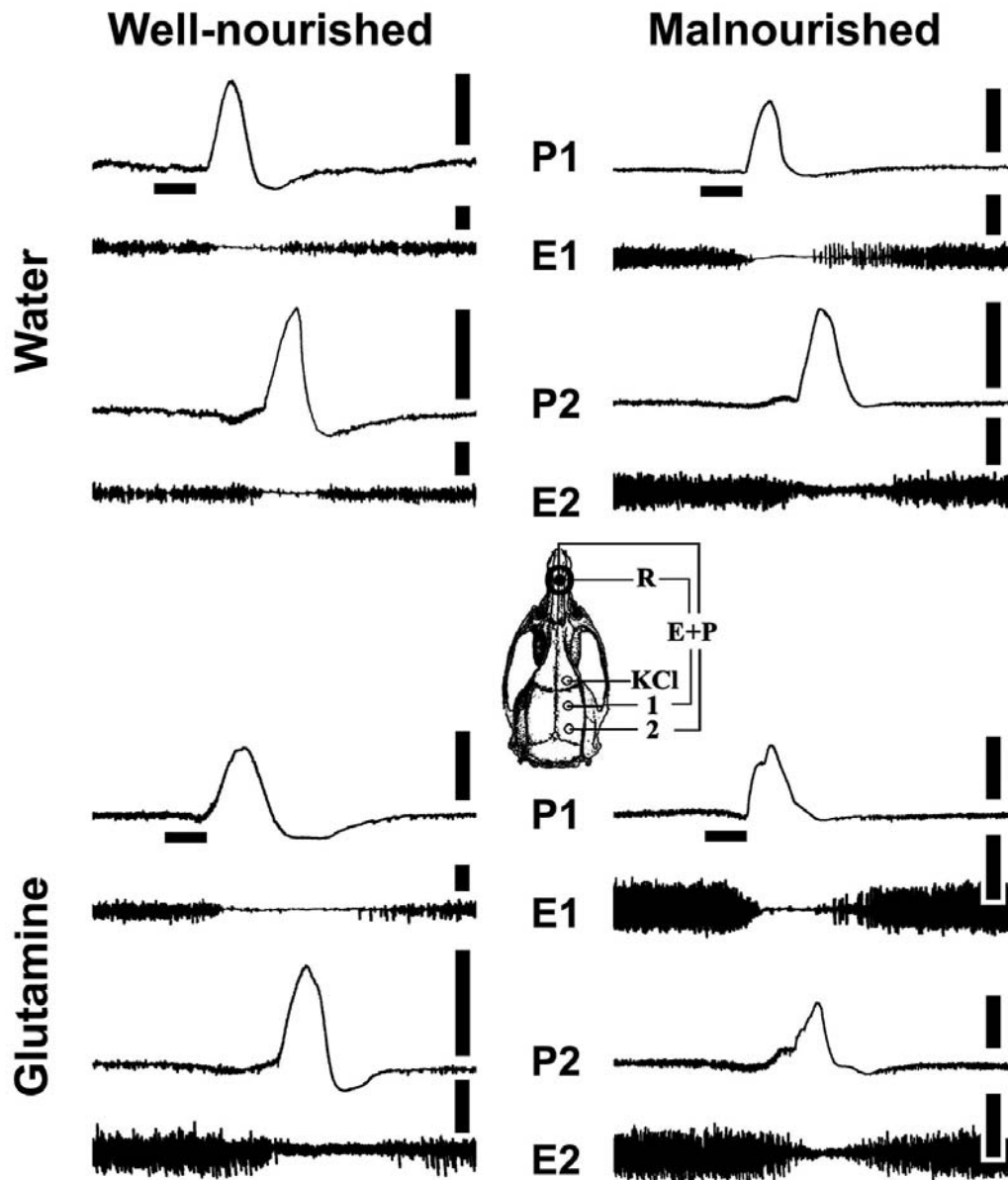


Figure 2 - Electrophysiological recordings (ECoG [E] and slow potential change [P]) in right hemisphere of two 30-40days-old well-nourished and two malnourished rats, which were treated per gavage from postnatal day 7 to 27 with water or glutamine. The horizontal bars in P-trace 1 indicate the period (1 min) in which stimulation with 2% KCl was applied to the frontal region of the same hemisphere, to elicit SD. The inset shows the recording positions 1 and 2, from which the traces marked at center with the same numbers were obtained. The position of the common reference electrode (R) and the application place of stimulus (KCl) are also shown. Vertical bars correspond to 10mV in P and 1mV in ECoG (negative upwards).

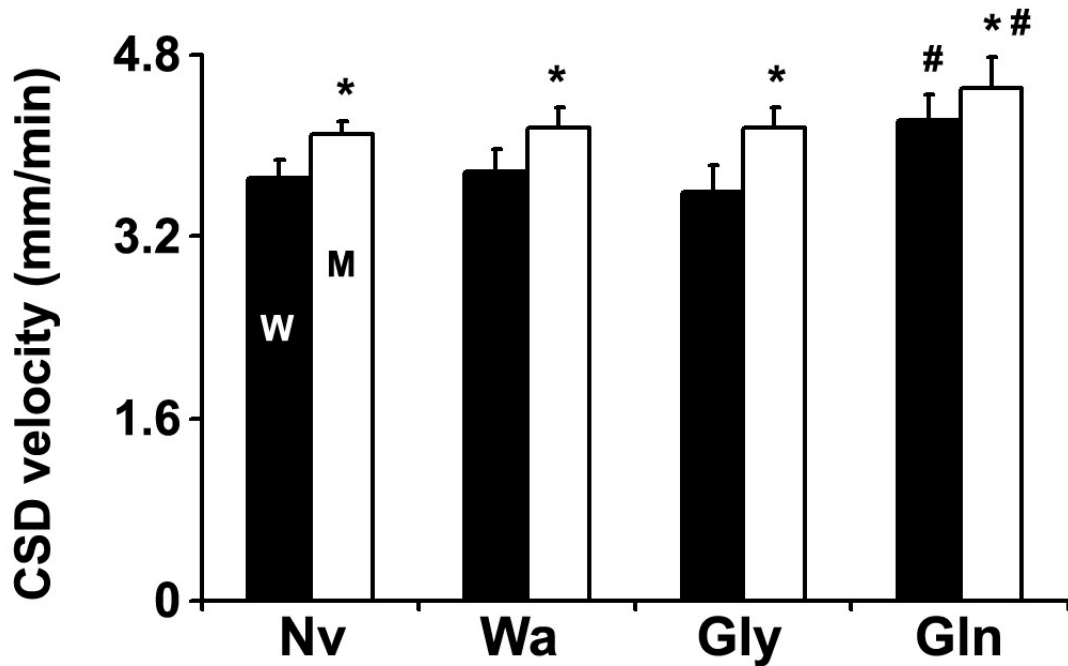


Figure 3 - Mean (\pm standard deviation) velocity of propagation of cortical spreading

depression (CSD) of well-nourished and malnourished 30-40 days-old rats. In each nutritional condition, gavage treatment early-in-life with 500 mg/kg/d of glutamine (Gln) was associated with higher CSD velocities (#), as compared with the distilled water- (Wa) or glycine (Gly) treatments, as well as with a gavage-free condition (naïve group; Nv). Asterisks indicate that the CSD velocities in the malnourished groups are different from the corresponding well-nourished groups ($P < 0.05$; ANOVA plus Tukey test).

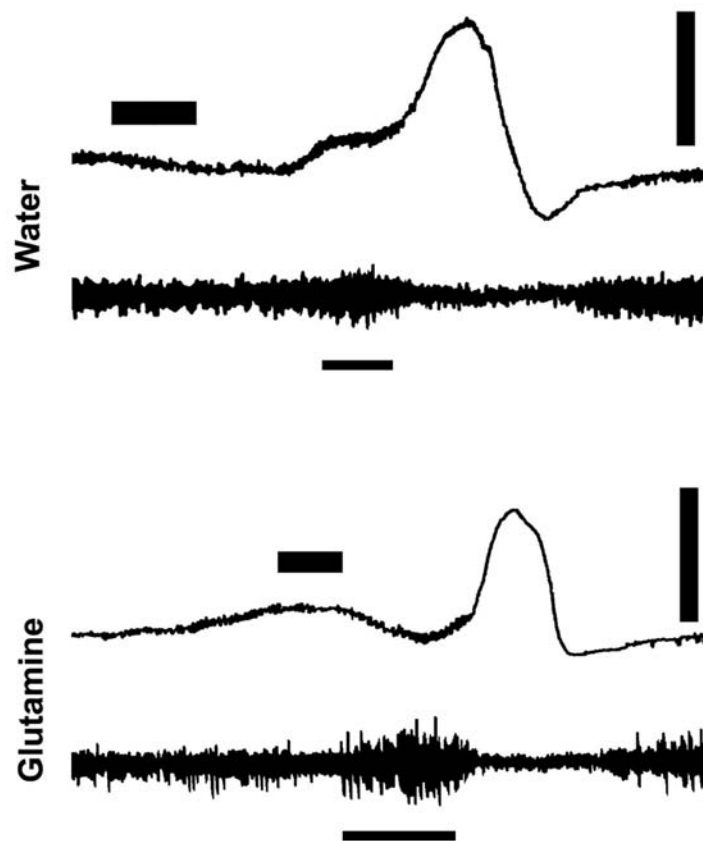


Figure 4 – CSD recordings in one control- and one glutamine- rat (gavage-treated respectively with water and 500mg/kg/d of glutamine) showing a burst of activity (marked by the thinner horizontal bar under the electrocorticograms) just before the appearance of CSD (indicated by the slow DC potential change shown in the upper trace for each rat). In both animals, the recordings were performed at the region marked as “point 2” in the inset of figure 2. One can note that the ECoG hyperactivity is more intense and lasts longer in the glutamine treated rat. The thicker horizontal bars indicate the period (1 min) in which stimulation with 2% KCl was applied to the frontal region to elicit SD. The right vertical bars correspond to 10mV for the slow DC potential changes and 1mV for the ECoGs (negative upwards).

Table 1 – Amplitudes, duration and rise- and recovery times of the CSD slow potential shifts in the 8 groups (4 well-nourished and 4 malnourished groups). Data are expressed as mean±standard deviation. No significant intergroup differences could be observed.

GROUPS	CSD SLOW POTENTIAL SHIFTS			
Well-nourished	Amplitudes (mV)	Duration (s)	Rise times (s)	Recovery times (s)
Naïve	7.5 ± 1.9	66.2 ± 10.5	36.5 ± 4.7	29.7 ± 8.8
Water	7.8 ± 2.4	68.5 ± 12.7	36.4 ± 7.9	32.1 ± 12.4
Glycine	9.7 ± 1.6	65.7 ± 11.5	37.8 ± 7.5	27.9 ± 6.6
Glutamine	7.1 ± 2.3	76.0 ± 20.5	44.1 ± 8.7	31.9 ± 19.3
Malnourished				
Naïve	9.6 ± 0.4	69.9 ± 13.8	37.6 ± 4.5	32.3 ± 11.6
Water	8.7 ± 1.3	67.6 ± 15.0	35.4 ± 6.8	32.2 ± 11.4
Glycine	7.4 ± 2.3	68.9 ± 13.3	38.8 ± 7.4	30.1 ± 8.3
Glutamine	7.7 ± 2.1	66.9 ± 10.3	36.4 ± 7.1	30.6 ± 8.2

Table 2 – Number of rats presenting a burst of ECoG hyperactivity just before CSD appearance, as well as the mean duration of such bursts (documented in Figure 4). In the glutamine-treated groups, the burst duration behaved with a non-significant tendency to increase.

Well-nourished groups	n	Burst duration (s; means \pm sd)
Naïve	6	47.2 \pm 10.4
Water	3	51.4 \pm 1.3
Glycine	6	42.5 \pm 7.0
Glutamine	5	69.0 \pm 19.6
Malnourished groups		
Naïve	5	34.3 \pm 6.2
Water	3	40.0 \pm 8.7
Glycine	2	39.2 \pm 13.0
Glutamine	2	70.8 \pm 3.5

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- A Gln, quando suplementada enteralmente, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, facilitou a propagação da DAC em ratos recém-desmamados.
- A desnutrição, obtida pela manipulação do tamanho das ninhadas, não aboliu o efeito facilitatório da suplementação com Gln sobre a DAC.
- Em ambas as condições nutricionais, o tratamento com Gln, durante o período de aleitamento, não afetou a evolução ponderal e nem o peso encefálico dos animais.
- O efeito facilitatório da Gln sobre a DAC não pode ser atribuído ao aumento da oferta de nitrogênio, conseqüente ao tratamento com esse aminoácido, uma vez que tal efeito não foi obtido nos animais que receberam quantidade equivalente de nitrogênio proveniente da Gly.
- A redução dos pesos corporal e encefálico, nos animais mantidos em ninhadas maiores, confirmou a reprodutibilidade desta técnica em promover déficit nutricional.

Visando dar continuidade a este trabalho, pioneiro na demonstração dos efeitos da suplementação enteral com Gln sobre a DAC, sugere-se como perspectivas, investigar, no rato:

- Os efeitos da administração da Gln, de forma aguda ou por curto prazo, sobre a DAC.
- A permanência (ou não) dos efeitos da suplementação precoce com Gln sobre a DAC em diferentes fases da vida: animal jovem, adulto e idoso.

- Modificações dos efeitos da Gln sobre a DAC em condições favoráveis de lactação, representadas por ninhadas com número reduzido de filhotes.
- Os efeitos, sobre a DAC, de diferentes doses de Gln (por meio de uma “curva dose-resposta”), bem como de diferentes vias de administração deste aminoácido.
- A dosagem dos níveis cerebrais de Gln, GLU e GABA em animais suplementados com Gln, a fim de correlacioná-los com os efeitos eletrofisiológicos ora descritos.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES, R. et al. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 8, p. 1417-1421, 2008.
- ALBRECTCH, J.; SONEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, H. S.; SCHOUSBOE, A. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 12, p. 332-343, 2007.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, p. 275-282, 2006.
- AN, J. H. et al. Effects of glucose and glutamine concentration in the formulation of the artificial cerebrospinal fluid (ACSF). **Brain Research**, v. 1218, p. 77-86, 2008.
- ANDRADE, A. F. D.; GUEDES, R. C. A.; TEODÓSIO, N. R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, p. 889-893, 1990.
- ANDRADE, J. P. et al. The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. **Experimental Brain Research**, v. 109, n. 3, p. 419-433, 1996.
- BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 641-653, 2006.
- BENTON, D. The influence of children's diet on their cognition and behavior. **European Journal of Nutrition**, v. 47(Suppl 3), p. 25-37, 2008.
- BERBEL, P. et al. Iodine supplementation during pregnancy: a public health challenge. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, p. 338-343, 2008.
- BERGER, M. et al. Spreading depression enhances human neocortical excitability *in vitro*. **Cephalalgia**, v. 28, p. 558-562, 2008.

- BLACK, M. M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29 (Suppl), p. S126-S131, 2008.
- BRÖER, S.; BROOKES, N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, p. 705-719, 2001.
- BUREŠ, J.; BUREŠOVÁ, O.; KRIVÁNEK, J. **Some metabolic aspects of Leão's spreading cortical depression**. In: TOWER, D. B.; SCHADÉ J. P. (Eds). *Structure and Function of the Cerebral Cortex*. Amsterdam: Elsevier, 1960, p. 257-265.
- BUREŠ, J.; BUREŠOVÁ, O.; KRIVÁNEK, J. **The Mechanisms and Applications of Leao's Spreading Depression of Electroencephalographic Activity**. Praga: Academia, 1974. 410p.
- CABRAL-FILHO, J. E.; TRINDADE-FILHO, E. M.; GUEDES, R. C. A. Effect of d-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, 347-350, 1995.
- CHOI, K. et al. The effect of oral glutamine on 5-fluorouracil/leucovorin-induced mucositis/stomatitis assessed by intestinal permeability test. **Clinical Nutrition**, v. 26, p. 57-62, 2007.
- COOPER, A. J. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, n. 4, p. 280-286, 2001.
- COSTA-CRUZ, R. R. G.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R. C. A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 271-275, 2006.
- COSTA-CRUZ, R. R. G.; GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 303, p. 177-180, 2001.
- DALLAS, M. J. et al. Enteral glutamine supplementation for very-low-birth-weight infants decreases hospital costs. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, n. 6, p. 352-356, 1998.

- DEBASSIO, W. A. et al. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. **Brain Research Bulletin**, v. 41, n. 6, p. 379-383, 1996.
- DE LUCA, B.; CIOFFI, L. A.; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Activitas Nervosa Superior**, v. 19, p. 130-131, 1977.
- DÍAZ-CINTRA, S. et al. Effects of prenatal protein deprivation on the postnatal development of granule cells in the fascia dentata. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 310, n. 3, p. 356-364, 1991.
- DOBBING J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON A. N.; DOBBING J. **Applied Neurochemistry**. Oxford: Blackwell, 1968. p. 287-316.
- DO CARMO, R. J.; FERREIRA-FILHO, C. R. Efeitos de glutamato, glutamina e K⁺ na impedância elétrica e voltagem do córtex cerebral na ausência e durante a depressão alastrante. **Ciência e Cultura**, v. 28 (Suppl), p. 466, 1976.
- DO CARMO, R. J.; LEÃO, A. A. P. On the relation of glutamic acid and some allied compounds to cortical spreading depression. **Brain Research**, v. 39, p. 515-518, 1972.
- DO CARMO, R. J.; MARTINS-FERREIRA, H. Spreading depression of Leao probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, p. 401-421, 1984.
- DO MONTE-SILVA, K. K. et al. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, n. 3/4, p. 187-194, jun/aug 2007.
- DUGGAN, C. et al. Glutamine supplementation in infants with gastrointestinal disease: a randomized, placebo-controlled pilot trial. **Nutrition**, v. 20, p. 752-756, 2004.
- ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v. 35, p. 245-296, 1990.
- FERNANDEZ, V.; PASCUAL, R.; RUIZ, S. Early life environmental deterioration, nutrition and ontogenesis of the motor cortex in the rat: a Golgi study. **Biology of the Neonate**, v. 64, p. 245-253, 1993.

- FRAZÃO, M. F.; MAIA, L. M. S. S.; GUEDES, R. C. A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v. 447, p. 26-30, 2008.
- GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, v. 38, p. 33-60, 2001.
- GORJI, A.; SPECKMANN, E. J. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 3371-3374, 2004.
- GUEDES, R. C. A.; ANDRADE, A. F. D.; CABRAL-FILHO, J. E. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. **Journal of Medicine and Biological Research Brazilian**, v. 20, p. 639-642, 1987.
- GUEDES, R. C. A.; BARRETO, J. M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 25, n. 4, p. 393-397, 1992.
- GUEDES, R. C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; TEODÓSIO, N. R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. In: DO-CARMO, R. J. (Ed). **Spreading Depression**. Experimental Brain Research Series, v. 23. Berlin: Springer, 1992, p. 17-26.
- GUEDES, R. C. A.; CAVALHEIRO, E. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Research**, v. 27, p. 33-40, 1997.
- GUEDES, R. C. A.; DO CARMO, R. J. Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental Brain Research**, v. 39, p. 341-349, 1980.
- GUEDES, R. C. A. 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: CRC Press, 2005, p. 39-54.
- GUEDES, R. C. A. et al. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. **Journal of Medicine and Biological Research**, v. 22, p. 923-925, 1989.

- GUEDES, R. C. A. et al. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutrition Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 115-23, 2002.
- GUEDES, R. C. A.; FRADE, S. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 26, p. 1241–1244, 1993.
- GUEDES, R. C. A.; PEREIRA-DA-SILVA, M. S. Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 26, n. 10, p. 1123-8, 1993.
- GUEDES, R. C. A.; SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N. R. Malnutrition and brain functions: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 293-301, 1996.
- GUEDES, R. C. A.; TSURUDOMI, K.; MATSUMOTO, N. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v. 1036, p. 109-114, 2005.
- GUEDES R. C. A.; VASCONCELOS, C. A. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neuroscience Letters**, v. 442, n. 2, p. 118-122, 2008.
- HALL, J. C.; HEEL, K.; MCCAULEY, R. Glutamine. **British Journal of Surgery**, v. 3, n. 3, p. 305-312, 1996.
- HIGASHIDA, H.; SAKAKIBARA, M.; MITARAI, G. Spreading depression in isolated carp retina. **Brain Research**, v. 120, n. 1, p. 67-83, 1977.
- INNIS, S. M. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain Research**, v. 1237, p. 35-43, 2008.
- KAR, B. R.; RAO, S. L.; CHANDRAMOULI, B. A. Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. **Behavioral and Brain Functions**, v. 4, p. 31, 2008.
- KORKMAZ, A. et al. Long-term enteral glutamine supplementation in very low birth weight infants: effects on growth parameters. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 49, n. 1, p. 37-44, 2007.

LACEY, J. M.; WILMORE, D. W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Reviews**, v. 48, p. 297-309, 1990.

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

LEÃO, A. A. P. Spreading depression. In: PURPURA, D. P. et al (Org). **Experimental Models of Epilepsy**. New York: Raven Press, 1972, p. 173-195.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 11 ed. São Paulo: Roca, 2005, 1242 p.

MARANHÃO-FILHO, P. A.; LEÃO, A. A. P. A note on the action of glutamine on cortical spreading depression. **Cephalalgia**, v. 11, p. 201-204, 1991.

MAYEVSKY, A. et al. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. **Brain Research**, v. 740, p. 268-274, 1996.

MARTINS-FERREIRA, H. et al. Circling spreading depression in isolated chick retina. **Journal of Neurophysiology**, v. 37, n. 4, p. 773-784, 1974.

MARTINS-FERREIRA, H. Spreading depression in chick retina. In: OOKAWA, T. (Ed.). **The Brain and Behavior of the Fowl**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1983. p. 317-333.

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

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 92-128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

MÜLLER, O.; KRAWINKEL, M. Malnutrition and health in developing countries. **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, p. 279-286, 2005.

- NEU, J. et al. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. **Journal of Pediatrics**, v. 131, n. 5, p. 691-699, 1997.
- NOVAK, F. et al. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 9, p. 2022-2029, 2002.
- NUBÉ M.; SONNEVELD, B. The geographical distribution of underweight children in Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, p. 764-770, 2005.
- ODEBODE, T. O.; ODEBODE, S. O. Protein energy malnutrition and the nervous system: the impact of socioeconomic condition, weaning practice, infection and food intake, an experience in Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 5, p 304-309, 2005.
- OLIVEIRA, V. A. et al. Determinantes dos déficits ponderal e de crescimento linear de crianças menores de dois anos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 5, p. 874-882, 2006.
- RICHTER, F.; LEHMENKÜHLER, A. Cortical spreading depression (CSD): Ein neurophysiologisches Korrelat der Migräneaura. **Schmerz**, v. 22, n. 5, p.544-546, 2008.
- ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES, R. C. A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663-669, 1997.
- ROCHA-DE-MELO, A. P. et al. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, n. 3/4, p. 155-160, 2006.
- ROGERO, M. M. et al. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. **Nutrition Research**, v. 24, p. 261-270, 2004.
- SANTOS-MONTEIRO, J. S. **Nutrição, Privação Sensorial Específica e Plasticidade Cerebral**. Recife: UFPE, 2000. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 2002. 96 p.
- SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N. R.; GUEDES, R. C. A.. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 3, p. 29-40, 2000.

- SANTOS, R. S. **Nutrição, hipertireoidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados**. Recife: UFPE, 2000. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2000. 62 p.
- TANI, H. et al. Modulation of epileptiform activity by glutamine and system A transport in a model of post-traumatic epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 25, p. 230-238, 2007.
- UDANI, P. M. Protein energy malnutrition (PEM), brain and various facets of child development. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 59, n. 2, p. 165-186, 1992.
- VALADARES, C. T.; ALMEIDA, S. S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, n. 1, 39-47, 2005.
- VAN DEN BERG, A. et al. Glutamine-enriched enteral nutrition in very-low-birth-weight infants and effects on feeding tolerance and infectious morbidity: a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 1397– 1404, 2005.
- VAN DEN BERG, A. et al. Glutamine-enriched enteral nutrition in very low-birth-weight infants: effect on the incidence of allergic and infectious diseases in the first year of life. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 161, n. 11, p. 1095-1101, 2007.
- VAN HARREVELD, A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. **Journal of Neurochemistry**, v. 3, p. 300-315, 1959.
- VASCONCELOS, C. A. C. et al. Malnutrition and REM-sleep Deprivation Modulate in Rats the Impairment of Spreading Depression by a Single Subconvulsing Dose of Pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 163-170, 2004.
- WANG, L.; MAHER, T. J.; WURTMAN, R. J. Oral L-glutamine increases GABA levels in striatal tissue and extracellular fluid. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 1227, 1232, 2007.
- WEISSTAUB, G.; ARAYA, M. Acute Malnutrition in Latin America: The Challenge of Ending Avoidable Deaths. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 47, p. S10–S14, 2008.
- XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. C. A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal

and malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 12, p. 1277-1281, 1991.

YOUNG, V. R.; AJAMI, A. M. Glutamine: The Emperor or His Clothes? **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2449S-2459S, 2001.

YUDKOFF, M. Brain metabolism of branched-chain aminoacids. **Glia**, v. 21, p. 92-98, 1997.

ANEXOS

ANEXO A – Confirmação da submissão do artigo ao periódico

De: "Life Sciences" lifesci@elsevier.com
Para: rc.guedes@terra.com.br, rguedes@ufpe.br
Cópia:
Data: 7 Nov 2008 00:46:56 +0000
Assunto: Submission Confirmation

Dear Prof. Guedes,

Your submission entitled "L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences

Esta mensagem foi verificada pelo E-mail Protegido Terra.
Atualizado em 06/11/2008

Rubem C.A. Guedes, MD, PhD
Professor of Neurophysiology and Nutrition
Dept. of Nutrition, UFPE (Federal Univ. of Pernambuco State)
50670-901 Recife, PE, Brazil
e-mail: rc.guedes@terra.com.br
Phone: +55-81-21268936
Fax: +55-81-21268473

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

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Ofício nº 23/07

Recife, 03 de maio de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes**
Departamento de Nutrição - UFPE
Processo nº 004628/2007- 81

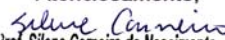

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da suplementação com L-Glutamina sobre o fenômeno da depressão alastrante cortical em ratos lactentes normais e desnutridos”.

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

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

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

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

ANEXO C – Composição da dieta Labina

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

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

Enriquecimento por Kg de Produto:

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

Níveis de Garantia:

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

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](#)