

**MANUELLA BATISTA DE OLIVEIRA**

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

**RECIFE**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MANUELLA BATISTA DE OLIVEIRA**

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

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

**Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes**

**-Recife- 2008**

**Oliveira, Manuella Batista de**

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

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

Inclui bibliografia e anexos.

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

613.2  
612.3

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

UFPE  
CCS2008-049

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

**Manuella Batista de Oliveira**

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

Banca Examinadora



1. Prof. Ana Paula Rocha de Melo;



2. Prof. Angela Amâncio dos Santos;



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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

**LISTA DE ABREVIATURAS**

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

## LISTA DE FIGURAS

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

**LISTA DE TABELAS**

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

## RESUMO

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

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

**ABSTRACT**

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

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

## SUMÁRIO

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

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 Manipulação nutricional e sistema nervoso

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2 Eletroestimulação cortical, sistema nervoso e manipulação nutricional

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

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

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

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

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

### **1.3 Depressão alastrante cortical, manipulação nutricional e estimulação elétrica cortical**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Modificada de GUEDES, 2005.

## 2.0 JUSTIFICATIVA

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

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

## 3.0 HIPÓTESES

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

## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

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

### 4.2 Objetivos específicos

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

## 5.0 METODOLOGIA

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

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

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

### *5.1 Manipulação do estado nutricional no aleitamento*

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

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

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

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

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

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

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

<sup>a</sup> = cozido, seco e moído.

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

---

Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bocálcico, sal, pré-mix.

---

**ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO**

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

**NÍVEIS DE GARANTIA**

Umidade (máx)	13%
Proteína (mín)	23%
Extrato Etéreo (mín)	4,0%
Matéria fibrosa (máx)	5,0%
Matéria mineral (máx)	10,0%
Cálcio (Ca)(máx)	1,3%
Fósforo (P)	0,85%

---

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

### **5.2 Procedimentos cirúrgicos para os registros eletrofisiológicos**

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

### **5.3 Registro eletrofisiológico**

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

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

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

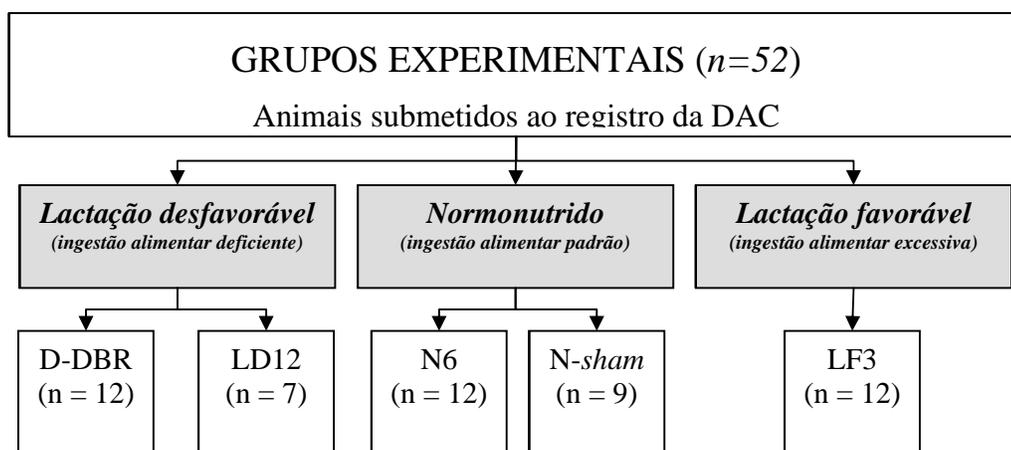
A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer esta distância. Para cada uma das horas de registro foram calculadas as velocidades médias de propagação do fenômeno.

#### **5.4 Eletroestimulação Cortical**

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

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

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



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

### **5.5 Determinações Ponderais**

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

### **5.6 Análise estatística**

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

## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 Pesos corporais

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

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

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

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

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

## **6.2 Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical**

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

### ***Efeitos da manipulação nutricional***

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

### ***Efeitos da eletroestimulação cortical repetitiva (ECr)***

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

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

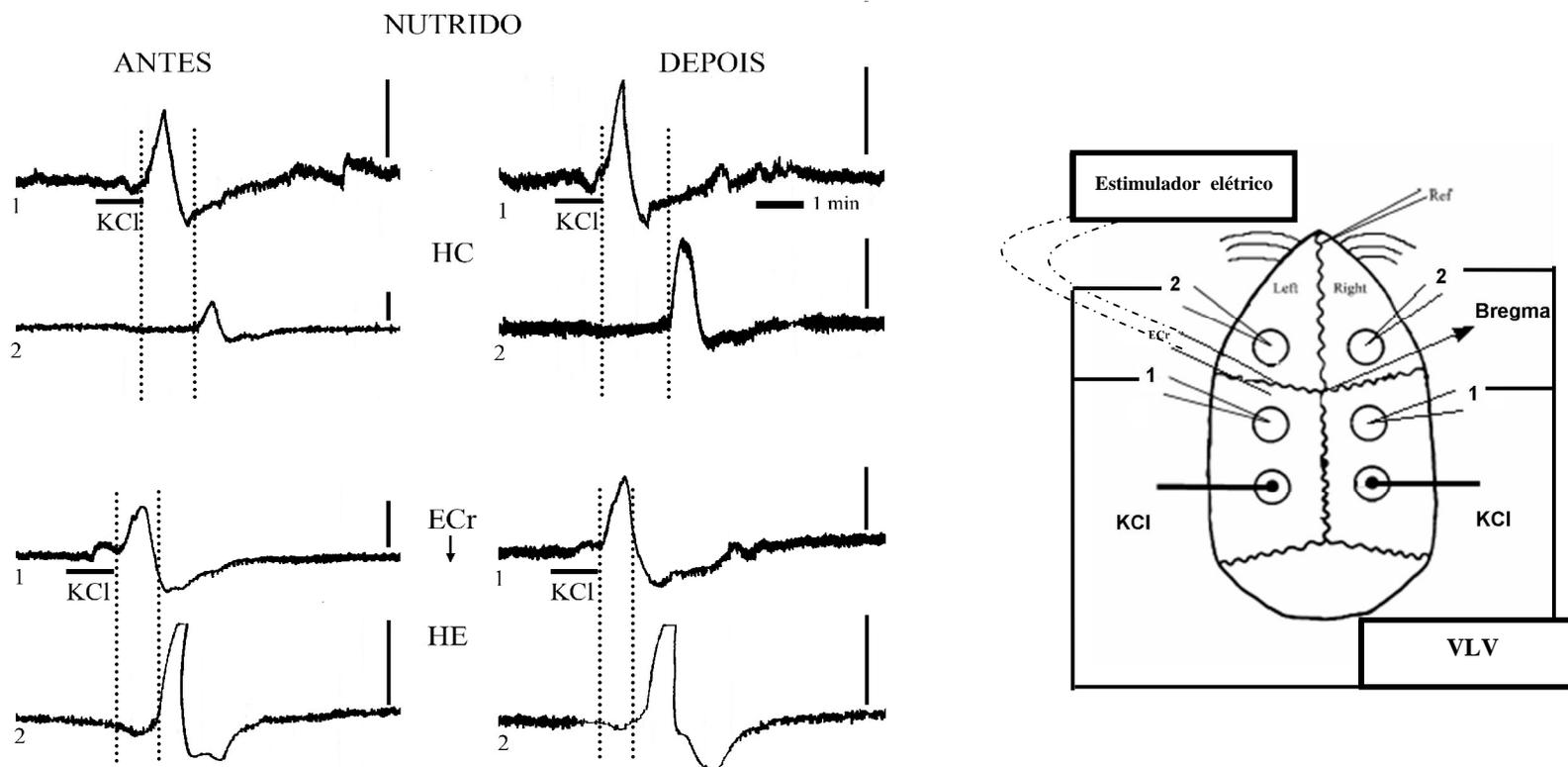
hemisfério controle, ou seja as velocidades de propagação da DAC foram significativamente maiores no hemisfério estimulado, em todos os grupos experimentais, em relação aos valores do hemisfério controle após a ECr. O maior efeito da ECr foi observado no grupo N6. Esse efeito foi estatisticamente significativo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

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

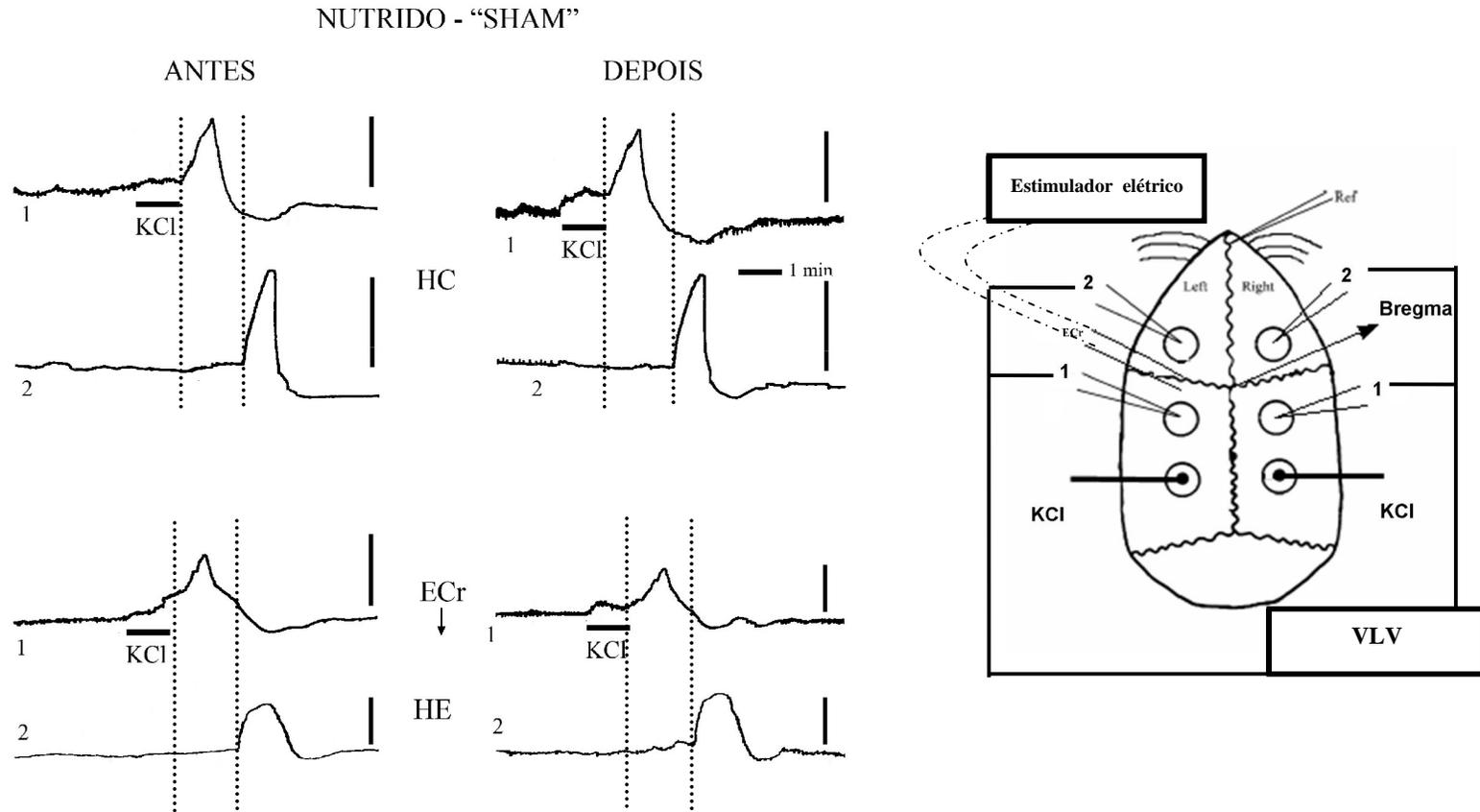
Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.0 e na figura 7.0.

#### ***Análise do número de DAC espontâneas***

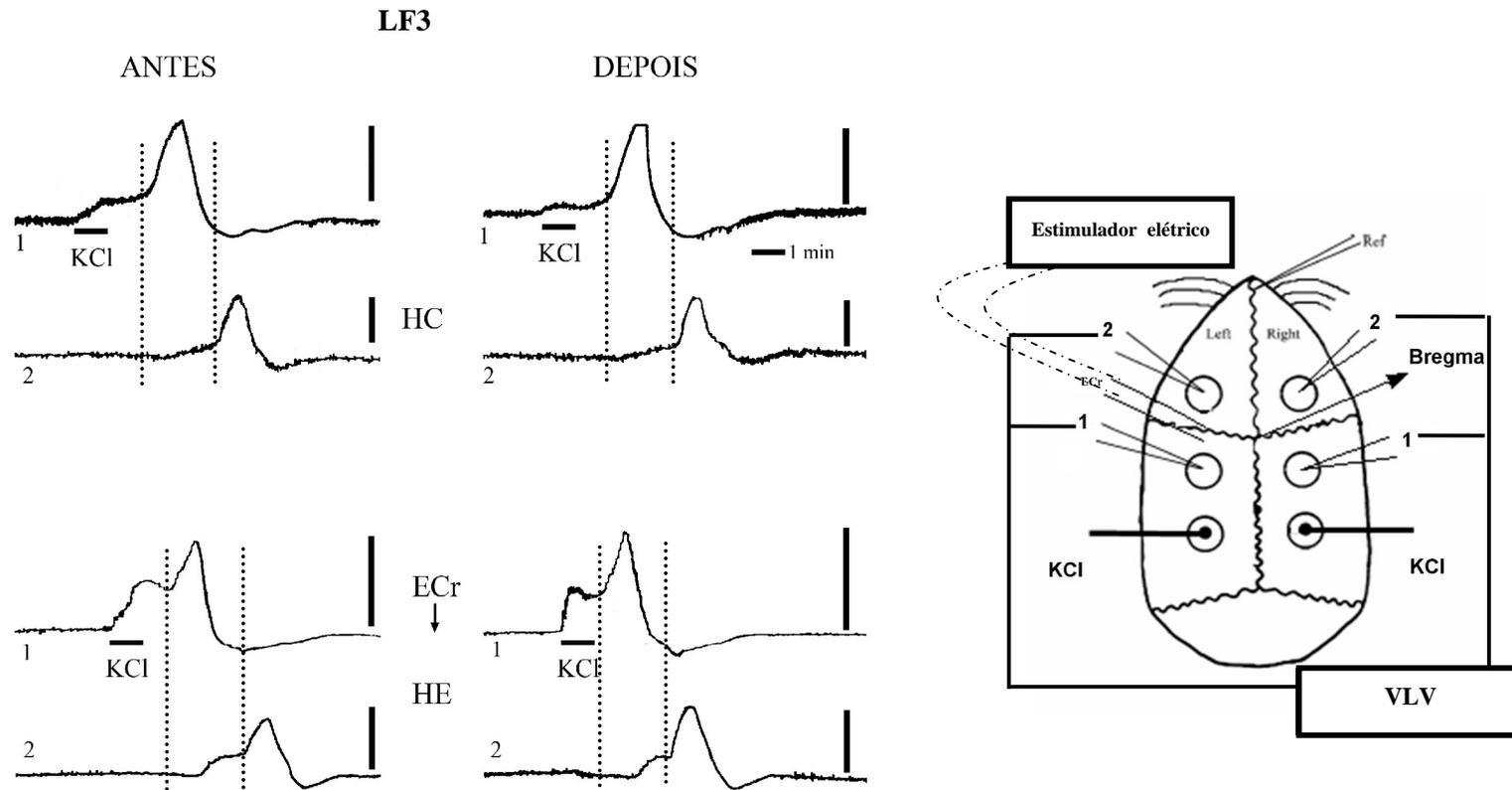
Como anteriormente referido, em geral, a aplicação tópica de KCl a 2% por 1 min deflagrava uma única onda de DAC. No entanto, eventualmente observou-se o surgimento de episódios de DAC na ausência do estímulo químico, ou seja, sem a estimulação intencional, que era feita regularmente. Quando a incidência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



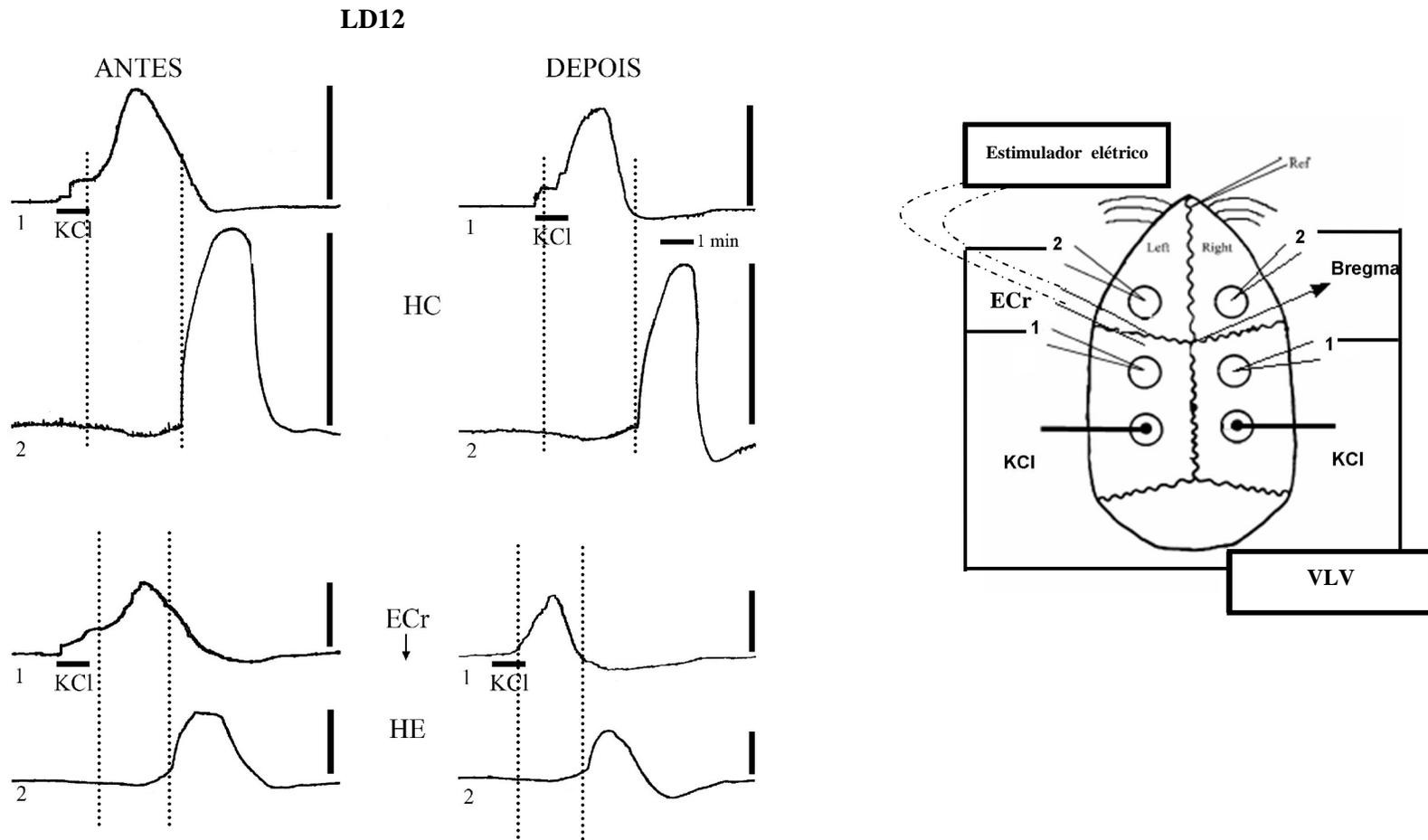
**Figura 2.0** - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo nutrido (N6). Neste grupo, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizes alimentadas com a dieta “LABINA” (contendo 23% de proteína). Após o desmame, os filhotes também receberam a dieta “LABINA”. Os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



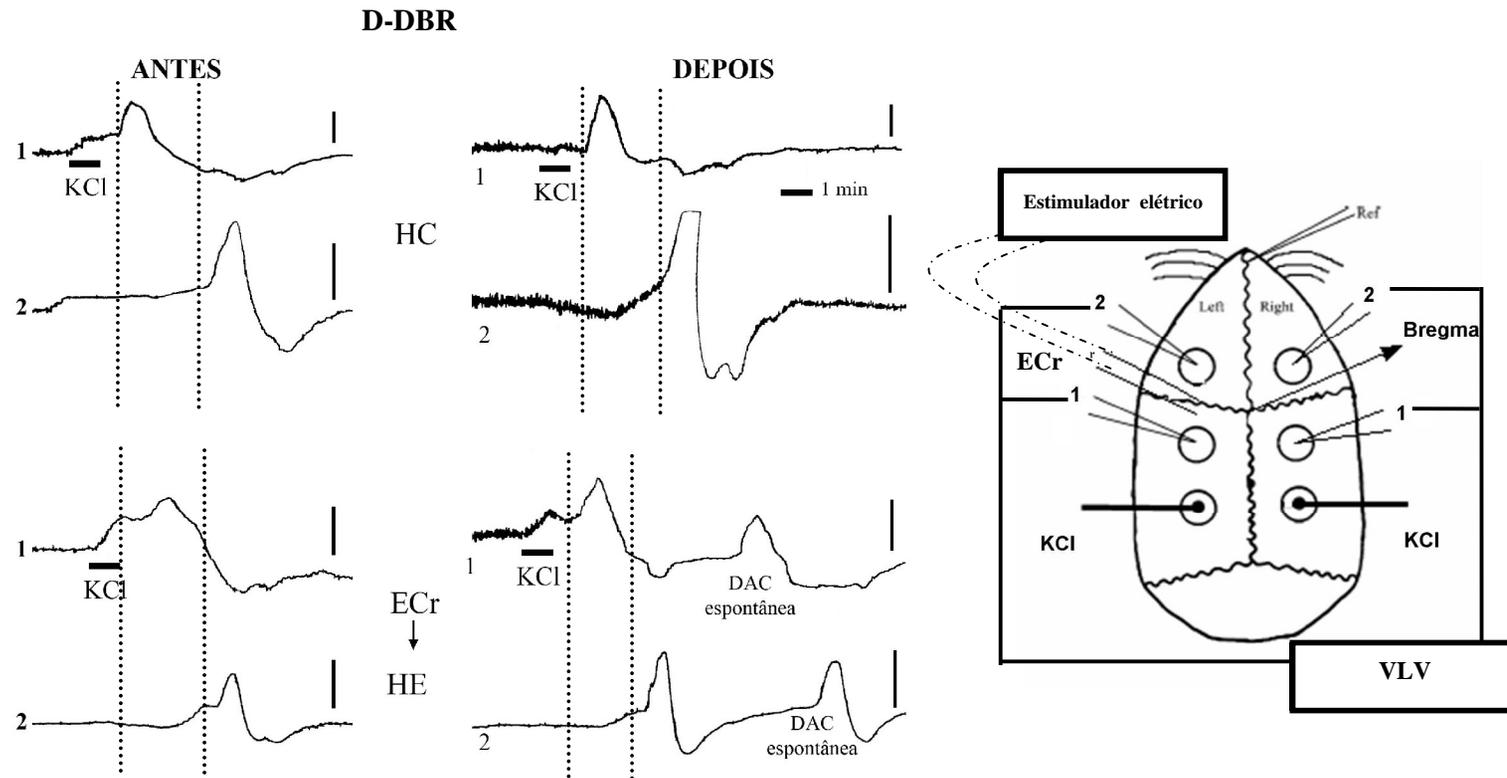
**Figura 3.0** - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo N-*sham*. Neste grupo, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizas alimentadas com a dieta "LABINA" (contendo 23% de proteína). Após o desmame, os filhotes também receberam a dieta "LABINA". Os registros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



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



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



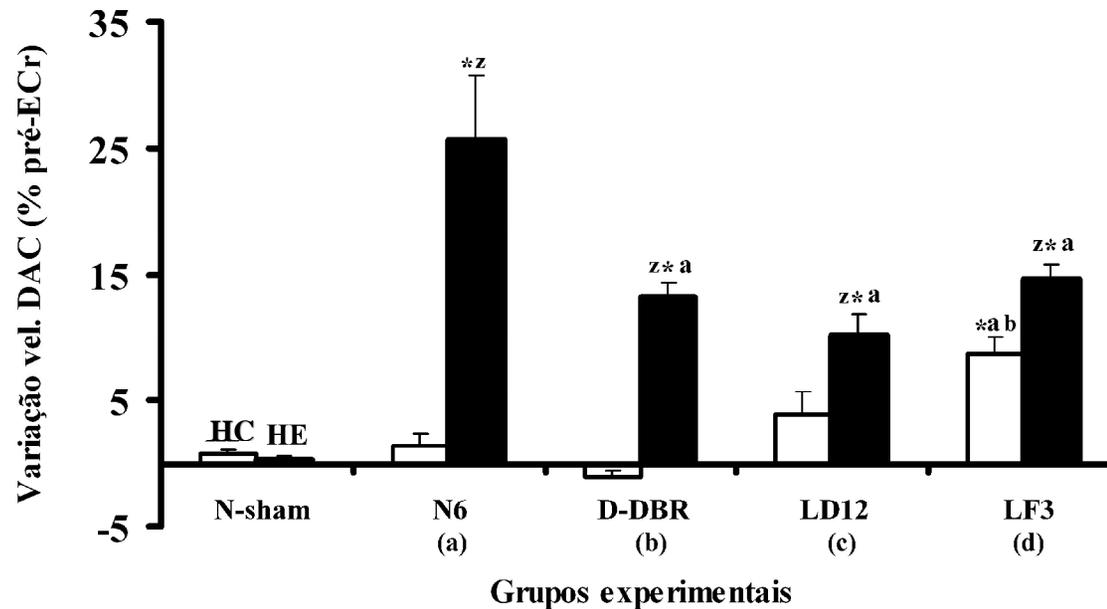
**Figura 6.0** - Registros da variação lenta de voltagem (VLV) da DAC em um animal do grupo desnutrido pela dieta básica regional (D-DBR). Nele, as ninhadas de 6 filhotes foram amamentadas por nutrizas alimentadas com a DBR (contendo 8% de proteína). Após o desmame, os filhotes receberam a dieta “LABINA”.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

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

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

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

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



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

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

### ***7.1 A manipulação nutricional precoce e a evolução ponderal***

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 8.0 CONCLUSÕES

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

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

## 9.0 PERSPECTIVAS

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

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

## 10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression  
*Neuroscience Letters* 391 51–55;
9. BOËX C , VULLIEMOZ S; SPINELLI L; POLLO C; SEECK M. (2007) High and low frequency electrical stimulation in non-lesional temporal lobe epilepsy. *Seizure* 16, 664—669
  10. BURT, T; LISANBY, SH & SACKEIM, HA (2002) Neuropsychiatric applications of transcranial magnetic stimulation: a meta analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*, 5, 73-103.
  11. CABRAL-FILHO, JE; TRINDADE-FILHO, EM; GUEDES, RCA. (1995) Effect of d-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 347-350.
  12. COSTA-CRUZ, RRG. e GUEDES, RCA. (2001) Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neuroscience Letters* 303, 177–180.
  13. DAVIDOWA H & PLAGEMANN A (2000). Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. *Neuroscience Letters* 293: 21-24.
  14. DAVIDOWA H; LI Y; PLAGEMANN A (2002). Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. *Regulatory Peptides* 108: 103–111.
  15. DAVIDOWA H; Li. Y; PLAGEMANN A (2003). Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur. J. Neurosci* 18: 613-621.
  16. DE LUCA B; CIOFFI LA; BURES J (1977). Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nervosa Superior* 19:130-131.
  17. DOBBING J. (1968). Vulnerable periods in developing brain. In: Davison AN, Dobbing J. *Applied neurochemistry*. Oxford: Blackwell, 287-316.

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

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

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

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

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

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

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

**ANEXOS**

# 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](#)