

**Márlison José Lima de Aguiar**

**EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS  
DA CAFEÍNA NO RATO ADULTO PREVIAMENTE  
DESNUTRIDO DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Márlison José Lima de Aguiar**

**EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS  
DA CAFEÍNA NO RATO ADULTO PREVIAMENTE  
DESNUTRIDO DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.*

**Orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos A. Guedes**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Cilene Rejane R. Alves**

**2010**

Aguiar, Marlison José Lima de  
Efeitos eletrofisiológicos e comportamentais da cafeína  
no rato adulto previamente desnutrido durante o  
desenvolvimento / Marlison José Lima de Aguiar. –  
Recife: O Autor, 2010.  
84 folhas; il., fig., tab. e Graf.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de  
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição. 2. Cafeína. 3. Lítio. 4. Inibição latente.  
5. Depressão alastrante cortical. I. Título.

612.391  
613.26

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

UFPE

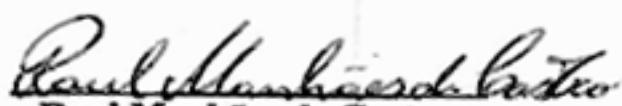
CCS2010-044

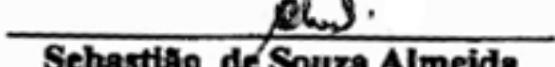
**Marlison José Lima de Aguiar**

**Efeitos eletrofisiológicos e comportamentais da cafeína no  
rato adulto previamente desnutrido durante o  
desenvolvimento**

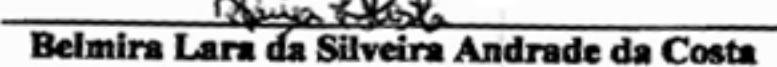
**Tese aprovada em 12 de março de 2010**

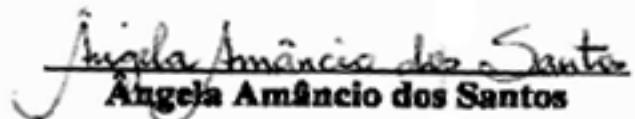
**Banca Examinadora**

  
**Raul Manhães de Castro**

  
**Sebastião de Souza Almeida**

  
**Maria Lúcia Bustamante Simas**

  
**Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa**

  
**Angela Amâncio dos Santos**

**À Deus por me permitir chegar a este momento  
Ao Prof. Rubem que me aceitou e apoiou  
À minha esposa, Cilene, que me acompanhou nesta luta**

## **AGRADECIMENTO**

**Agradeço aos meus professores e a todos aqueles que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional. Em especial:**

**Ao Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes, meu orientador que com paciência e dedicação me apoiou, incentivou na longa jornada do doutorado.**

**A Profa. Dra. Cilene Rejane Ramos Alves de Aguiar, minha co-orientadora, que muito me ajudou, incentivou e me acompanhou na minha vida profissional e pessoal.**

**Ao meu pai, pelo exemplo de superação, paciência, dignidade e moral.**

**A minha mãe, que frente as adversidades da vida batalhou por nós e por dias melhores.**

**Ao CNPq, pelo auxílio financeiro durante estes quatro anos de curso de doutorado.**

**Ao Dr. França, Hamilton, Paulino que sempre me ajudaram na obtenção dos animais e confecção de dietas.**

**A todos meus colegas do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) e do Departamento de Nutrição, que não irei mencionar, que caso eu esqueça algum nome, seria injusto.**

**De onde ela vem?! De que matéria bruta  
vem essa luz que, sobre as nebulosas  
cai de incógnitas criptas misteriosas  
como as estalactites de uma gruta?!**

**Vem da psicogenética e alta luta  
do feixe de moléculas nervosas,  
que, em desintegrações maravilhosas,  
delibera, depois quer e executa!**

**Vem do encéfalo absconso que a constringe,  
chega em seguida às cordas da laringe,  
tíssica, tênue, mínima e raquítica...**

**Quebra a força centrípeta que a amarra  
mas, de repente, e quase morta, esbarra  
no molambo da língua paralítica!**

*(Augusto dos Anjos, 1884-1914)*

## RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a interação dos efeitos cerebrais da cafeína e da desnutrição. Ratas Wistar foram desnutridas no aleitamento pela dieta básica regional (DBR, com 8% de proteínas de origem predominantemente vegetal). Seus filhotes receberam, aos 70-75 dias de idade, 30 mg/kg de cafeína ou solução salina, por via intraperitoneal. Parte desses animais foi testada no modelo comportamental conhecido como “inibição latente” (IL). A outra parte foi submetida ao estudo do fenômeno da “depressão alastrante da atividade elétrica cerebral (DAC). A cafeína bloqueou a IL, tanto no grupo DBR<sub>8</sub> quanto em um grupo controle, bem-nutrido. Num terceiro grupo, desnutrido pela DBR<sub>22</sub>, suplementada na *quantidade* (22%), mas não na *qualidade* das proteínas (suplementação à custa dos alimentos da DBR), o efeito da cafeína sobre a IL desapareceu. Como, na IL, os animais precisam ser injetados com cloreto de lítio (LiCl), estudou-se também os efeitos do LiCl sobre a DAC. A cafeína não alterou, enquanto o LiCl reduziu a propagação da DAC no grupo DBR<sub>8</sub>, mas não nos grupos nutrido e DBR<sub>22</sub>. Nossos resultados demonstram efeitos antagônicos da cafeína sobre a IL e do LiCl sobre a DAC, os quais dependem do estado nutricional durante o desenvolvimento cerebral, sugerindo interação droga-nutrição. Sugere-se também o envolvimento da cafeína na modulação de receptores subcorticais, envolvidos com a atenção seletiva no núcleo acumbens, mas sem ação expressiva no neocortex, onde a DAC foi avaliada.

**Palavras-chave:** Desnutrição; Cafeína; Lítio; Inibição latente; Depressão alastrante cortical; Atenção.

## ABSTRACT

In this work, the interaction between the cerebral effects of caffeine and malnutrition was studied. Female Wistar rats were malnourished during the lactation period by the regional basic diet, with 8% protein predominantly from vegetable sources (RBD<sub>8</sub>). Their pups, at 70-75 days of age, received for 4 consecutive days either 30 mg/kg caffeine or saline solution, via intraperitoneal injection. Part of these animals was tested in the behavioral model known as "latent inhibition" (LI). The other part was submitted to the study of the phenomenon known as "cortical spreading depression" (CSD) of the brain electrical activity. Caffeine blocked LI in the RBD<sub>8</sub> as well as in a control, well-nourished group. This behavioral effect of caffeine was not seen in another malnourished group fed a protein-supplemented RBD (protein content increased to 22% by increasing the proportion of the same foodstuffs from vegetable origin; RBD<sub>22</sub> group), suggesting an interaction between caffeine and dietary protein content. Since in LI procedure the animals had to be injected with lithium chloride (LiCl), we decide also to study the effects of LiCl on CSD. Caffeine did not alter CSD, whereas LiCl reduced the CSD propagation in the RBD<sub>8</sub>-, but not in the well-nourished and in the RBD<sub>22</sub> group. Our results demonstrate antagonistic effects (1) of caffeine on LI and (2) of LiCl on CSD, both effects depending on the nutritional status during the cerebral development, suggesting a drug-nutrition interaction. It is suggested the involvement of caffeine in the modulation of subcortical receptors, involved with selective attention processes in the nucleus accumbens, but without expressive action in the neocortex, where CSD was evaluated.

**Keywords:** Malnutrition; Caffeine; Lithium; Latent Inhibition; Alastrant depression cortical; Attention.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

1. ANOVA – Análise de Variância
2. CS: Estímulo condicionado (Inglês. Condition stimulation)
3. CAF: Cafeína
4. CPP: Preferência condicionada de lugar
5. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível superior
6. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
7. CTA: Teste de aversão gustativa condicionada (Inglês. Conditioned taste aversion)
8. DAC: Depressão Alastrante Cortical (sinônimo de DA)
9. DBR<sub>8</sub>: Dieta básica regional com oito por cento de proteína
10. DBR<sub>22</sub>: Dieta básica regional com vinte e dois por cento de proteína
11. dH<sub>2</sub>O: Água destilada
12. ECoG: Eletrocorticograma
13. EEG: Eletroencefalograma
14. ip.: Intraperitoneal
15. Kcal%: Kilocaloria porcentagem
16. KCl: Cloreto de potássio
17. LAFINNT: Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
18. LiCl: Cloreto de lítio
19. LI: Inibição latente (Ing. Latent inhibition)
20. NPE: Não pré-exposto
21. OMS/FAO 32: Organização Mundial de Saúde/ Organização para agricultura e alimentação das Nações Unidas - NU. (comunicado de Imprensa conjunto número 32)
22. p: Significância estatística

- 23. PE: Pré-exposto
- 24. pH: Indica se uma solução líquida é ácida
- 25. RSS: Razão de supressão a sacarose
- 26. SAL: Salina
- 27. UFPE: Universidade Federal de Pernambuco
- 28. UI: Unidade internacional
- 29. US: Estímulo neutro (Inglês. Unconditioned stimulus)
- 30. VLV: Variação lenta de voltagem
- 31. 5-HT: Serotonina
- 32. °C: Graus Celsius

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. BJETIVO.....	16
2.1- Geral.....	16
2.2- Específicos.....	16
3.HIPÓTESES.....	16
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4.1- Nutrição, processos fisiológicos, processos comportamentais e cafeína.....	17
4.1.1- Nutrição e processos fisiológicos.....	17
4.1.2- Nutrição e processos comportamentais.....	18
4.1.3- Cafeína, processos fisiológicos e comportamentais.....	19
4.1.4- Cloreto de lítio, processos fisiológicos e comportamentais.....	21
5. MODELOS DE DESNUTRIÇÃO: A DIETA BÁSICA REGIONAL .....	22
E SUA SUPLEMENTAÇÃO	
5.1- Dieta Básica Regional (DBR ).....	23
5.2- Uma suplementação da dieta básica regional: a DBR <sub>22</sub> .....	23
6. MODELO COMPORTAMENTAL E ELETROFISIOLÓGICO.....	25
6.1- O Modelo comportamental da Inibição Latente.....	25
6.2- O Modelo eletrofisiológico da depressão alastrante cortical.....	27
7. MÉTODOS.....	28
7.1- Dietas.....	29

7.1.1- Dieta de manutenção do biotério (MB) .....	29
7.1.2- Dieta básica regional (DBR <sub>8</sub> ) e sua suplementação (DBR <sub>22</sub> ).....	29
7.2- Modelo comportamental de inibição latente (LI).....	29
7.2.1- Equipamento.....	31
7.2.2- Procedimento.....	31
7.3- O fenômeno eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC).....	32
7.3.1- Procedimento cirúrgico.....	33
7.3.2- Estimulação cortical.....	33
7.3.3- Registro eletrofisiológico .....	33
7.4- Peso corporal.....	34
7.5- Drogas.....	34
7.6- Análise dos resultados.....	35
8. RESULTADOS.....	35
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
10. PERSPECTIVAS.....	72
11. REFERÊNCIAS.....	73
Anexo A.....	82
Aprovação do Comitê de ética	
Anexo B.....	83

Documento de encaminhamento do artigo: “**Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats**”, ao periódico Nutritional Neuroscience.

Anexo C.....84

Documento de encaminhamento do artigo: “**Caffeine impairs latent inhibition, but not spreading depression in malnourished rats**”, ao periódico Physiology & Behavior.

## 1. INTRODUÇÃO

Os macro e micronutrientes dos alimentos são utilizados pelo organismo para a produção de energia, para as sínteses orgânicas (hormônios, neurotransmissores e outras moléculas fisiologicamente relevantes), bem como, durante o desenvolvimento, para a formação de estruturas celulares. Alimentações inadequadas, associadas ou não a manipulações sensoriais ou motoras, podem ocasionar alterações permanentes em algumas estruturas e funções cerebrais durante o desenvolvimento (ALMEIDA *et. al.*, 2002; MORGANE *et. al.*, 1978, 1993). No rato, o período do aleitamento (do nascimento até o 21º dia de vida) é muito importante para o desenvolvimento morfo-fisiológico cerebral, e é denominado fisiologicamente como: Período de Crescimento Rápido do Cérebro. Muitas vezes, a capacidade cerebral de modificar sua estratégia de desenvolvimento e/ou de funcionamento em face de solicitações ou alterações orgânicas e ambientais (conhecida como “plasticidade neural”), evidencia-se como resultado adaptativo do organismo às manipulações do meio ambiente (MORGANE *et. al.*, 1978, 1993; WINICK; ROSSO; BRASEL, 1972).

Alterações em alguns parâmetros comportamentais como humor, temperamento, percepção e motivação, também podem ser ocasionadas pelo desequilíbrio de alguns nutrientes na dieta, tais como as proteínas, ou pelo consumo de fármacos psico-estimulantes, como a cafeína. Dietas ricas em proteínas parecem aumentar os níveis de aminas cerebrais, o que pode resultar na melhora de estados depressivos, possivelmente por fornecer sensações de mais vigor, prazer e alerta em pessoas que estão com baixa motivação na realização de aprendizagens diárias (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005). Associado ao fator nutricional, o consumo de cafeína pode determinar alterações comportamentais (FREDHOLM *et. al.*, 1999; HOLLOWAY JUNIOR, 1982; MCKIM, 1996; SINTON; VALATY; JOUVET, 1981; SOBOTKA; SPAID; BRODIE, 1979) e eletrofisiológicas relevantes para a função cerebral (SIEPMANN; KIRCH, 2002). É observação freqüente na sociedade moderna que a população em geral, independente da faixa etária e do poder econômico, associa o consumo de cafeína (através do popular “cafezinho”) à ingestão inadequada de alguns nutrientes, tais como proteínas. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), é um estimulante que em doses na faixa de 10 a 40 mg/kg, ocasiona um aumento da atividade motora e dificuldade na discriminação correta de estímulos por diminuir a percepção para estímulos negativos (MCKIM, 1996; NIKODIJEVIĆ; DALY, 1993). Em altas doses (acima de 40 mg/kg), produz um estado de

insônia, irritabilidade, cefaléia, vertigens e zumbidos (FREDHOLM *et. al.*, 1999; MCKIM, 1996; SINTON; VALATY; JOUVET, 1981; SOBOTKA; SPAID; BRODIE, 1979).

Por outro lado, o uso de dietas com baixo teor protéico, tal como a *Dieta Básica Regional* (DBR – que contém apenas 8% de proteína), pode provocar severas e, muitas vezes, permanentes alterações estruturais (PICANÇO-DINIZ *et. al.*, 1998), bioquímicas (TEODÓSIO *et. al.*, 1990), e eletrofisiológicas no Sistema Nervoso (GUEDES; ANDRADE; CABRAL-FILHO, 1987; GUEDES; CAVALHEIRO, 1997; ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997; SILVA *et. al.*, 1987). Os estudos eletrofisiológicos têm mostrado que a desnutrição precoce pela DBR facilita a propagação do fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC). Este fenômeno caracteriza-se por uma resposta do tecido cortical, provocada por estímulo mecânico, elétrico ou químico aplicado a um ponto desse tecido. Esta resposta consiste na diminuição (“depressão”) da atividade elétrica espontânea, que se propaga (“alastrante”) por todo o córtex cerebral. A desnutrição precoce pela DBR leva a alterações na propagação da DAC (GUEDES; ANDRADE; CABRAL-FILHO, 1987). Este efeito é revertido pela suplementação protéica da DBR, mas só quando esta suplementação é feita com proteínas de elevado valor biológico (caseína - ANDRADE; GUEDES; TEODÓSIO, 1990).

Mais recentemente, estudos comportamentais realizados no LAFINNT da UFPE, por Alves (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005), vêm demonstrando que a DBR também pode ocasionar alterações irreversíveis na aprendizagem de estímulos funcionalmente relevantes, que requerem a participação da atenção, através do modelo comportamental da ***Inibição Latente (LI)***. Este fenômeno é considerado um modelo de atenção que tem como base o fato de que a pré-exposição repetida de um estímulo neutro dificulta um condicionamento posterior, quando este estímulo tem a função de estímulo condicionado (ALVES; GUERRA; SILVA, 1999; LUBOW; MOORE, 1959). No modelo da LI, o sujeito aprende que este estímulo não sinaliza evento de importância ou relevância motivacional, por não estar correlacionado a qualquer reforço, e, devido a essa característica, o sujeito não presta atenção ao estímulo, ocorrendo o que Mackintosh chamou de aprendizagem de irrelevância (MACKINTOSH, 1974).

Diante do exposto acima, decidiu-se investigar melhor os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos da cafeína no rato adulto, previamente desnutrido, durante o desenvolvimento. Considerou-se a presente proposta original e inovadora, uma vez que a interação cafeína-estado nutricional, nos seus aspectos comportamentais e eletrofisiológicos, não tem sido investigada, a julgar pela inexistência de literatura específica pertinente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

Avaliar, no rato adulto previamente desnutrido pela DBR, os efeitos da cafeína sobre parâmetros comportamentais da função cerebral (LI) e eletrofisiológicos (DAC). Adicionalmente, investigar se a suplementação da DBR na quantidade de proteínas (elevação de 8 para 22%), mas não na sua qualidade (elevação às custas dos mesmos alimentos da DBR original) modificaria tais efeitos; e, por último, como nos procedimentos que foram utilizados na LI foi necessário tratar os animais com cloreto de lítio, decidiu-se avaliar se haveria interação entre o cloreto de lítio e a DAC.

### 2.2 Específicos

- 1) Verificar o efeito da cafeína e/ou desnutrição precoce pela DBR sobre o comportamento de atenção, através do modelo da LI.
- 2) Investigar se a suplementação quantitativa, mas não qualitativa das proteínas da DBR influenciaria o efeito acima.
- 3) Averiguar se a cafeína teria efeitos sobre a propagação da DAC e se os dois tipos de desnutrição (DBR com 8% ou 22% de proteína) influenciam esse efeito.
- 4) Analisar se o cloreto de lítio (LiCl) administrado previamente no modelo comportamental da LI é capaz de interferir no fenômeno da DAC.
- 5) Verificar se haveria uma correlação entre as respostas comportamentais e eletrofisiológicas mensuradas neste trabalho.

## 3. HIPÓTESES

A cafeína afetaria o fenômeno comportamental da LI e o fenômeno eletrofisiológico da DAC e a desnutrição durante o desenvolvimento cerebral modificaria os eventuais efeitos da cafeína.

O tratamento com cloreto de lítio, necessário no procedimento da LI, afetaria também a propagação da DAC.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1. Nutrição, processos fisiológicos, processos comportamentais e cafeína

A saúde é definida como um estado completo de bem-estar físico, mental e psíquico, e para que esteja presente no indivíduo é necessário considerar a estreita correlação entre nutrição, processos comportamentais e fisiológicos. Quando esta tríade não está em perfeito equilíbrio, ela interfere na imunidade, morbidade e mortalidade do indivíduo (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; CHAVES *et. al.*, 1975). Desta forma, podemos colocar em destaque a importância da nutrição para a manutenção do equilíbrio dos processos comportamentais e fisiológicos necessários para a sobrevivência do indivíduo (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; BRANDÃO; MORATO, 2002; DOUGLAS, 2002).

#### 4.1.1. Nutrição e processos fisiológicos

As necessidades nutricionais fundamentais dos seres humanos, tais como calculadas atualmente, resultam na ingestão diária de alimentos que devem fornecer aproximadamente, 10 a 15% de proteínas, 15 a 30% de gorduras e 55 a 75% de carboidratos; bem como menos de 5g de sal iodinizado e pelo menos 400g de frutas e legumes (OMS/FAO 32, 2003). Estes nutrientes são utilizados fisiologicamente para a produção da energia necessária à manutenção dos processos fisiológicos, bem como para a síntese de hormônios, neurotransmissores, citoesqueleto e membranas celulares, dentre outros. Quando ocorre algum tipo de alteração, de ordem quantitativa e/ou qualitativa, na dieta, esta pode levar a variações mínimas em funções normais de um ser vivo, tais como: pressão arterial, osmolaridade, pH, concentração iônica e outros componentes (DOUGLAS, 2002; MALNIC; AFECHE; CIPOLLA-NETO, 1999).

Uma dieta balanceada qualitativamente e quantitativamente, em seus nutrientes, favorece o desenvolvimento e a organização funcional dos organismos, em especial do

sistema nervoso (embriogênese). Entretanto, quando as deficiências alimentares ocorrem no período inicial da vida (em ratos, durante o período de aleitamento e, em seres humanos, do 6º ou 7º mês de gestação até 3º ano de vida, aproximadamente) podem comprometer o desenvolvimento do sistema nervoso. Esse período é conhecido como período crítico ou “Período de Crescimento Rápido do Cérebro”. Por ser um período de intensa atividade cerebral, nele são observadas altas taxas de neurogênese, gliogênese, mielinização e migração celular (DOBBLING, 1968). A manipulação nutricional experimental nesse período pode ocasionar alterações permanentes na quantidade de neurônios, na estrutura do córtex, na arborização dendrítica, no número de alguns segmentos dendríticos, no calibre dendrítico de suas espinhas, da proliferação glial, do diâmetro axonal e da mielinização (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; BEDI, 2003; DOUGLAS, 2002; MORGANE *et. al.*, 1993). Pode-se verificar também a ocorrência de retardo na maturação do neocôrtex, bem como pela redução do peso do cérebro e cerebelo (MORGANE, 1993). Isto pode ocasionar, na idade adulta, um cérebro mais suscetível às agressões do ambiente, as quais quando muito severas, algumas vezes podem produzir efeitos irreversíveis, tanto comportamentais como eletrofisiológicos, dentre outros (ALMEIDA, 2002; ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; MORGANE *et. al.*, 1993).

#### **4.1.2. Nutrição e processos comportamentais**

Alguns processos comportamentais também parecem sofrer a influência dos nutrientes. O humor, o temperamento, a percepção, a motivação podem estar alterados. Por exemplo, dietas ricas em proteínas parecem aumentar os níveis de dopamina e noradrenalina cerebrais, resultando em melhora dos estados depressivos e também podem fornecer sensações de mais vigor, prazer e alerta em pessoas que se encontram desmotivadas para a realização de tarefas diárias envolvendo aprendizagem (FERNSTROM, 1983). Outros estudos demonstram que dietas ricas em carboidratos parecem produzir efeito tranqüilizante, sonolência e diminuição da atenção. Estes últimos efeitos indicam que os níveis de 5-HT parecem estar aumentados em condições de sobrecarga alimentar de carboidratos (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; FERNSTROM, 1983, 2000; MORATO, 2004). Por outro lado, dietas pobres em triptofano diminuem os níveis de 5-HT resultando em uma maior sensibilidade à dor, bem como aumentam o comportamento sexual e de agressividade (FERNSTROM, 2000).

Outros trabalhos científicos mostram que a deficiência alimentar durante diferentes períodos do desenvolvimento, tal como na embriogênese, também parece ter uma relação com o processo comportamental. Estas pesquisas mostram que a sensibilidade e a percepção de estímulos parecem estar alteradas na desnutrição. Respostas comportamentais frente a estímulos ambientais, bem como diante de funções mais elaboradas, como execução e coordenação de tarefas motoras, aprendizagem e memória, podem ser diretamente afetadas pela intensidade e duração da desnutrição. Em outras palavras, sujeitos submetidos a este insulto demonstram ter dificuldade de fazer novas associações frente aos estímulos ambientais (ALMEIDA, 2002; ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; MORGANE *et. al.*, 1993).

#### **4.1.3 Cafeína, processos fisiológicos e comportamentais**

Na sociedade moderna a população em geral, independente da faixa etária e do poder econômico consome a cafeína diariamente (SOUZA; SICHERI, 2005). Essa substância está presente em nossa alimentação, através do consumo do café, do chá, do cacau e/ou do chocolate, do mate e do guaraná, e de outros alimentos e medicamentos. Todos estes produtos se caracterizam por conter substâncias do grupo das xantinas (cafeína, teofilina e teobromina), sendo o mais potente a cafeína (Tabela 01). A cafeína é extraída em grande escala da planta *Coffea arábica* e pode ser ingerida através de infusões, medicamentos ou de refrigerantes industrializados à base de cola e energéticos (SOUZA; SICHERI, 2005).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um fármaco que interfere com o metabolismo normal de nucleotídeos cíclicos por ação na enzima fosforodiesterase (SUTHERLAND; RALL, 1958). Atua também em receptores de adenosina (DALY; BRUNS; SNYDER, 1981). Os efeitos estimulantes da cafeína, recentemente descobertos, devem-se basicamente à sua atuação sobre os receptores de adenosina dos subtipos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (DELUCIA; PLANETA, 2004), onde o receptor de adenosina A<sub>1</sub> atua sobre o receptor de dopamina D<sub>1</sub> e o A<sub>2A</sub> atua no receptor D<sub>2</sub>, por diferentes vias (ENSLEN; MILON; WURZNER, 1980; FREDHOLM *et. al.*, 1999). Esses efeitos neuroquímicos da cafeína podem ser observados por meio de alterações de alguns parâmetros comportamentais como humor, temperamento, percepção e motivação (HOLLOWAY JUNIOR, 1982; SINTON; VALATY; JOUVET, 1981; SOBOTKA; SPAID; BRODIE, 1979). Igualmente, tais efeitos se refletem em respostas eletrofisiológicas da função cerebral, como por exemplo, o eletroencefalograma (SIEPMANN; KIRCH, 2002). Entretanto,

atualmente não se tem qualquer trabalho publicado referente ao efeito da cafeína sobre o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC).

**Tabela 01. Valores de cafeína encontrados em alguns produtos**

<i>Fontes de Cafeína</i>	Dose em miligrama
Café	29 a 176 mg/xícara
Chá	8 a 107 mg/xícara
Chocolate	5 a 10 mg/xícara
Refrigerantes do tipo Cola	32 a 65 mg/360 mL
Comprimidos para resfriados e alergias, e em analgésicos	15 a 64mg/U
Moderadores de apetite	50 a 200mg/U
Estimulantes	100 a 200mg/U
<b>Drogas prescritas</b>	30 a 100mg de cafeína por cápsula
<b>Drogas não prescritas</b>	15 a 200mg por cápsula

Segundo SOUZA, R. A. G.; SICHERI R., 2005

Estudos sugerem que a ação da cafeína sobre o comportamento é dependente da dose utilizada. Para possuir propriedades estimulantes deve ser administrada em doses de 10 a 40 mg/kg (DELUCIA *et al.*, 2007; FREDHOLM *et al.*, 1999; MCKIM, 1996). Em modelos animais, diversos efeitos comportamentais da cafeína foram estudados: (1) aumento da atividade locomotora espontânea no modelo de campo aberto (MCKIM, 1996; NIKODIJEVIĆ; DALY, 1993), (2) dificuldade na discriminação de estímulos em modelos de discriminação visual (DALY, 1993) e (3) diminuição da percepção frente a estímulos

negativos, como por exemplo, choque elétrico, através do modelo de esquiva condicionada (FREDHOLM *et al.*, 1999; MCKIM, 1996). Outros achados demonstraram que a cafeína poderia produzir efeito conhecido como *preferência condicionada do lugar* (CPP), o qual sugere uma ação reforçadora da droga em animais (BROCKWELL; EIKELOOM; BENINGER, 1991). Entretanto, doses acima de 40 mg/kg, podem produzir um estado de insônia, irritabilidade, cefaléia, vertigens e zumbidos em seres humanos (FREDHOLM *et al.*, 1999; MCKIM, 1996).

A via de administração da cafeína, também, parece interferir em parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos. Estudos indicam que a cafeína quando administrada por via oral ou por via intravenosa em primatas, humanos e/ou ratos atua com propriedades reforçadoras, em respostas de estimulação eletrofisiológica e comportamental (GRIFFITHS, WOODSON, 1988; GRIFFITHS; MUMFORD, 1995). Por outro lado, o sabor amargo da cafeína pode interferir, principalmente, nos estudos comportamentais, uma vez que trabalhos realizados em ratos mostraram que apenas doses baixas de cafeína são livremente ingeridas pelo animal (HEPPNER; KEMBLE; COX, 1986). Desta forma, a consequência imediata de consumir oralmente a cafeína seria aversiva (pelo sabor amargo), interferindo no efeito reforçador posterior em modelos de auto-administração por via oral. Dados similares são observados em seres humanos, uma vez que foi demonstrado que o efeito reforçador da cafeína varia com a dose, ou seja, doses baixas e intermediárias mantêm o comportamento de auto-administração oral, e doses altas podem até produzir aversão (GRIFFITHS; MUMFORD, 1995).

#### **4.1.4 Cloreto de lítio, processos fisiológicos e comportamentais**

O Cloreto de lítio é um sal que exerce efeitos eletrofisiológicos e comportamentais em animais e humanos e tem sido utilizado em tratamentos clínicos do distúrbio bipolar (GEDDES *et al.*, 2004). Entretanto, pouco se sabe da interação do lítio com a nutrição, no que se refere aos efeitos cerebrais dessa substância.

Sabe-se que o lítio pode influenciar o funcionamento cerebral, agindo nesse órgão em nível morfológico e molecular, com impacto sobre fenômenos comportamentais e eletrofisiológicos (HAN *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2009; O'BRIEN; *et al.*, 2004). O lítio foi também associado com a pilocarpina, em modelos experimentais de convulsão; uma

simples administração de lítio pode influenciar a excitabilidade cerebral, intensificando o efeito da pilocarpina (HAN *et al.*, 2009).

Inúmeros grãos e vegetais consumidos pelos seres humanos, bem como a água que bebemos, pode eventualmente suprir o organismo com quantidades significantes de lítio (SCHRAUZER, 2002; WEINER, 1991) e alguns estudos sugerem uma relação inversa entre a concentração de lítio na água ingerida e o número de admissões de homicidas em hospitais psiquiátricos (DAWSON, 1991). Os rins e o cérebro são os órgãos que mais retém lítio no organismo, em comparação a outros órgãos (SCHRAUZER, 2002).

Por outro lado, é conhecido que fatores nutricionais, como, por exemplo, a desnutrição protéica, pode afetar o desenvolvimento cerebral, alterando a sua atividade eletrofisiológica (MORGANE *et al.*, 1978; MORGANE *et al.*, 1993). É bem conhecido que a desnutrição no início da vida aumenta a velocidade de propagação da Depressão Alastrante Cortical (DAC; DE LUCA, CIOFFI, BURES, 1977; ROCHA\_DE\_MELO, CAVALCANTI, BARROS, 2006). Efeitos semelhantes sobre a DAC foram também demonstrados com a administração de substâncias como os aminoácidos L-arginina (FRAZÃO, MAIA, GUEDES, 2008) e L-glutamina (LIMA *et al.*, 2009), e o derivado pirazolônico não-esteróide, com ação antipiretica/analgesica/anti-inflamatória, denominado dipirona (AMARAL *et al.*, 2009). Por outro lado, foi demonstrado em ratos adultos que a administração de lítio, através da alimentação, por um período de 15 dias, diminui a velocidade da propagação da DAC, em comparação com ratos que receberam dieta sem lítio (GUEDES *et al.*, 1989). Entretanto, nada se sabe sobre a ação de uma dose única de lítio, e nem sobre a sua interação com modificações nutricionais. Assim, utilizando o modelo eletrofisiológico da depressão alastrante cortical, procurou-se, neste trabalho, investigar esta interação.

## **5. MODELOS DE DESNUTRIÇÃO: A DIETA BÁSICA REGIONAL E SUA SUPLEMENTAÇÃO**

Os efeitos causados pela desnutrição no sistema nervoso podem ser estudados através de modelos experimentais. Nesses modelos a desnutrição é produzida por meio de manipulações que produzem déficit nutricional como: 1) fornecimento de uma dieta deficiente durante diferentes períodos do desenvolvimento do animal (é o caso da “Dieta Básica Regional” que será descrita detalhadamente no item 5.1); 2) aumento do número de filhotes

da ninhada, tornando maior a competição pelo leite materno, 3) ligadura cirúrgica em algumas tetas da nutriz reduzindo a oferta do leite materno, 4) submeter os filhotes à privação da companhia materna, durante algumas horas do dia, reduzindo assim o tempo disponível para a amamentação (ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005). Todas essas manipulações parecem provocar alterações quantitativas e/ou qualitativas no leite, que podem prejudicar o desenvolvimento físico, motor e mental do sujeito, em geral, comprometendo a maturação das redes neuronais, importantes para processos fisiológicos e comportamentais.

### **5.1 Dieta básica regional (DBR)**

A DBR é uma dieta experimental confeccionada com base em inquéritos nutricionais realizados em populações humanas na Zona-da-Mata de Pernambuco (BATISTA-FILHO, 1968, 1971). A constituição básica da DBR é: feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris*), farinha de mandioca (*Manioc esculenta*), batata doce (*Ipomaea batatas*) e charque (carne bovina salgada e prensada), que resulta numa deficiência quantitativa e qualitativa dos nutrientes, principalmente de proteínas (ver Tabela 2).

A DBR apresenta baixo teor protéico (8% de proteína), o que pode provocar severas e, muitas vezes, permanentes alterações estruturais (PICANÇO-DINIZ *et. al.*, 1998), bioquímicas (TEODÓSIO *et. al.*, 1990), e eletrofisiológicas no Sistema Nervoso (GUEDES; ANDRADE; CABRAL-FILHO, 1987; ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997; SILVA *et. al.*, 1987).

### **5.2 Uma suplementação da dieta básica regional: a DBR<sub>22</sub>**

A DBR<sub>22</sub> (Tabela 3) é uma suplementação da DBR original. É constituída pelos mesmos alimentos: feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris*), farinha de mandioca (*Manioc esculenta*), batata doce (*Ipomaea batatas*) e charque (carne **bovina** salgada e prensada). Desta forma, apesar de as duas dietas apresentarem quase a mesma quantidade de calorias, a DBR<sub>22</sub> apresenta maior quantidade de proteína predominantemente de origem vegetal, e uma menor quantidade de carboidratos (ANDRADE; GUEDES; TEODÓSIO, 1990). O valor protéico da DBR<sub>22</sub> parece ser muito próximo do valor ideal de proteína em uma dieta normal, como por

exemplo, a LABINA (23%) que é considerada balanceada e utilizada na manutenção dos animais no Biotério.

Estudos realizados com a DBR<sub>22</sub> revelam alterações eletrofisiológicas, em comparação com animais que consumiram uma dieta suplementada com lipídeos, vitamina, sais minerais e, principalmente, proteína de alto valor nutricional como caseína (ANDRADE; GUEDES; TEODÓSIO, 1990). Porém, ainda pouco se sabe sobre o efeito comportamental e fisiológico da DBR 22%, necessitando de ser mais bem investigada.

**TABELA 2** – Composição Centesimal da “Dieta Básica Regional” (**DBR**)<sup>a</sup>

Ingredientes	g%	Composição Centesimal					
		Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Cinzas	Fibras	Kcal%
Feijão							
Mulatinho <sup>b</sup>	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Farinha de							
Mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,80
Carne de							
Charque <sup>b</sup>	3,74	2,74	-	0,06	0,06	-	11,50
Gordura (da							
charque)	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata Doce <sup>b</sup>	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
TOTAL	100,00	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,64

**a** = segundo TEODÓSIO *et al.*, 1990.

**b** = cozido, desidratado e moído.

**TABELA 3** – Composição Centesimal da “Dieta Básica Regional” com 22% de proteína (**DBR<sub>22</sub>**)<sup>a</sup>

Ingredientes	g%	Composição Centesimal					
		Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Cinzas	Fibras	Kcal%
Feijão							
Mulatinho <sup>b</sup>	60,00	13,05	34,87	0,78	-	3,57	198,7
Farinha de Mandioca	23,16	0,30	17,36	0,04	-	2,01	71,00
Carne de Charque <sup>b</sup>	12,30	9,01	-	0,20	-	-	37,84
Batata Doce <sup>b</sup>	4,56	0,11	3,55	0,01	-	0,17	14,73
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>	<b>22,47</b>	<b>55,78</b>	<b>1,03</b>	<b>-</b>	<b>5,75</b>	<b>322,27</b>

**a** = segundo ANDRADE; GUEDES; TEODÓSIO, 1990

**b** = cozido, desidratado e moído.

## 6. MODELO COMPORTAMENTAL E ELETROFISIOLÓGICO

### 6.1 O Modelo comportamental da inibição latente

A atenção pode ser entendida como um complexo processamento de informação requerido por atos simples de percepção, linguagem e pensamento. Em um enfoque comportamental, a atenção, envolve seleção de estímulos relevantes: o comportamento passa a ser controlado por uma quantidade reduzida de estímulos, os quais estão correlacionados a consequências importantes (ALVES; GUERRA; SILVA, 1999; ALVES; SILVA, 2001, 2002; ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005). A Inibição Latente (LI) é um modelo animal muito utilizado no meio científico para estudar o efeito de manipulações de variáveis ambientais

sobre a atenção. O fundamento básico da LI é o fato de que a pré-exposição repetida a um estímulo neutro sem consequência dificulta um condicionamento posterior em que esse estímulo neutro passe a ter função de estímulo condicionado (ALVES; GUERRA; SILVA, 1999; ALVES; SILVA, 2001, 2002; ALVES; AGUIAR; GUEDES, 2005; WEINER *et. al.*, 1997). No estudo experimental da LI tem-se, basicamente, três fases experimentais, que ocorrem sempre na seguinte ordem cronológica: 1) Fase de *pré-exposição*: exposições não reforçadas de um estímulo neutro (sem nenhum valor reforçador); 2) Fase de *condicionamento*: pareamento do estímulo neutro com o estímulo incondicionado (US - estímulo eliciador de uma resposta reflexa ou automática); e 3) Fase de *teste*: em que se verifica o efeito do estímulo condicionado (CS) sobre uma resposta operante (ALVES; GUERRA; SILVA, 1999).

Vários procedimentos experimentais são propostos para estudar o fenômeno da LI. Um desses, procedimentos, é o da Aversão Gustativa Condicionada (CTA, do inglês, *conditioned taste aversion*), que foi utilizado neste trabalho. A CTA vem ganhando importância como ferramenta de pesquisa, uma vez que utiliza, como medida da força do condicionamento, a resposta de esquiva ao sabor de uma solução de alto poder reforçador, a sacarose, quando esta é associada a um estímulo aversivo brando (injeção de LiCl, *ip*). O LiCl, além de ter propriedades de estímulo aversivo, também é classificado como US, neste procedimento experimental, uma vez que é capaz de produzir respostas incondicionadas ou automáticas de supressão da ingestão da sacarose, supressão esta decorrente do mal-estar digestivo produzido pelo LiCl (TURGEON *et. al.*, 2000).

No procedimento da CTA, o animal privado de água passa por três fases experimentais: 1) pré-exposição a um estímulo (exposição ao paladar agradável produzido pela solução de sacarose a 5%); 2) pareamento desse estímulo com um estímulo aversivo incondicionado (US, indisposição induzida por LiCl); e, 3) teste da supressão de uma resposta operante em curso, tal como lamber em um bebedouro que contém solução de sacarose (ELLENBROEK; KNOBBOUT; COOLS, 1997; MOSER *et. al.*, 2000; TURGEON *et. al.*, 2000). Normalmente o animal que foi pré-exposto ao CS (solução de sacarose) tende a ignorar esse estímulo na fase de condicionamento e, consequentemente, não suprime a resposta quando o CS é apresentado na fase de teste. Em outras palavras, há um aumento do consumo de solução açucarada por esses animais na fase de teste. Evidencia-se, desta forma, a “inibição latente” que indica que a aprendizagem de um estímulo, ao qual o animal foi pré-exposto, não prediz qualquer mudança relevante no ambiente (MACKINTOSH, 1974). O animal controle,

que não foi pré-exposto ao CS, suprime normalmente a resposta quando testado após o condicionamento.

Devido a essas características, acima citadas, a LI é considerado um modelo adequado para o estudo comportamental da atenção em animal, pois o sujeito aprende que durante as apresentações não reforçadas do estímulo que o mesmo não sinaliza qualquer evento de importância ou relevância motivacional, devido a não estar correlacionado a qualquer reforço, ou seja, o sujeito não presta atenção ao estímulo. Este tipo de aquisição de informação foi denominado por Mackintosh (1974) de “aprendizagem de irrelevância”. Ignorar um estímulo que não tem consequência sobre o comportamento é um procedimento econômico, e tem provavelmente uma origem filogenética.

## **6.2 O Modelo eletrofisiológico da depressão alastrante cortical**

A depressão alastrante cortical (DAC) foi descoberta em 1944, pelo pesquisador brasileiro Aristides Azevedo Pacheco Leão, quando estudava a atividade eletrofisiológica (EEG) do córtex de coelho. Ele observou que a DAC, quando induzida experimentalmente, se propagava em todas as direções no córtex (LEÃO, 1944).

Descrita inicialmente como uma “onda” reversível e propagável de redução (depressão) da atividade elétrica cerebral espontânea e provocada, a DAC pode ter sua origem de forma “espontânea” ou provocada intencionalmente pelo pesquisador através de estimulação mecânica, química ou elétrica de um ponto do tecido cortical. Esta onda está acompanhada do aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno (LEÃO, 1947; LEHMENKÜHLER; GROTEMEYER; TEGTMEIER, 1993). Tanto a depressão do EEG quanto a VLV se propagam de forma concêntrica e gradual a partir do ponto estimulado até regiões corticais mais distantes. Em seguida à passagem da onda de DAC, a região atingida começa a se recuperar. De regra geral, a recuperação do EEG num determinado ponto do tecido ocorre após cerca de 5 a 10 minutos da passagem da DAC por esse ponto. A VLV possui características do tipo do “tudo ou nada”, ou seja, é uma onda que possui início e fim bem definidos e fáceis de identificar, e que sempre indica a existência de DAC. Assim, a VLV é muito usada para calcular a velocidade com que o fenômeno se propaga pelo tecido nervoso. Essa velocidade é o indicador utilizado para se avaliar a sensibilidade cerebral ao fenômeno (GUEDES, 2005).

A DAC se mostrou presente em todos os vertebrados estudados e em todos possui uma velocidade considerada baixa, na ordem de alguns milímetros por minuto, em comparação ao impulso nervoso, que é da ordem de metros por segundo. Variações na velocidade de propagação da DAC têm sido correlacionadas com inúmeros fatores, de interesse para a saúde humana, tais como nutrição, drogas, neurotransmissores, entre outros (GUEDES, 2005).

Devido às características acima citadas, a DAC é considerado um modelo adequado para o estudo eletrofisiológico de alterações causadas por diversos fatores em animais, uma vez que estas alterações se refletem na variação da sua velocidade. Estudos eletrofisiológicos em ratos têm mostrado que a desnutrição precoce pela DBR facilita a propagação do fenômeno da DAC (GUEDES; ANDRADE; CABRAL-FILHO, 1987).

## 7. MÉTODOS

Antes dos procedimentos metodológicos serem iniciados, o projeto de pesquisa referente a esta tese foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE, tendo sido aprovado (Anexo A)

**Sujeitos:** Ratos albinos Wistar, machos ( $n=142$ ), provenientes do Departamento de Nutrição, foram divididos em três grupos, de acordo com a dieta de suas mães durante o aleitamento: 1) dieta de manutenção do biotério (“Labina”; grupo nutrido); 2) DBR<sub>8</sub> (grupo desnutrido); 3) DBR<sub>22</sub> (grupo suplementado em quantidade, mas não na qualidade das proteínas). Após o desmame (25º dia de vida), todos passaram a receber a dieta “Labina”. Para evitar o “efeito de ninhada”, foram reunidos os filhotes de diferentes ninhadas, nascidos na mesma data, misturados e em seguida distribuídos 6 filhotes por mãe (“pool”). Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ) e de iluminação, com ciclo claro-escuro (claro de 6 às 18 h).

Nos experimentos comportamentais (LI), um total de 108 ratos foi utilizado, aos 75-85 dias de vida. Destes, 31 animais, que haviam sido tratados com lítio foram re-estudados aos 90-110 dias, nos experimentos eletrofisiológicos visando investigar os efeitos do LiCl sobre a DAC. Eles foram comparados (no primeiro artigo originado desta tese) a 34 ratos controle, que não passaram pela LI e nem receberam LiCl (foram tratados com solução salina em lugar do lítio). Nesses últimos 34 animais, estudou-se também o efeito da administração de cafeína sobre a DAC (segundo artigo desta tese), em experimentos nos quais foram comparadas as velocidades

da DAC antes e depois da aplicação da cafeína.

## 7.1 Dietas

### 7.1.1 Dieta de manutenção do biotério

Foi utilizada, como dieta controle (grupo nutrido), aquela empregada usualmente na manutenção da colônia do biotério. Essa dieta é balanceada e contém 23% de proteínas, sendo denominada comercialmente de “Labina” (Purina do Brasil Ltda – Tabela 4).

### 7.1.2 Dieta básica regional (DBR<sub>8</sub>) e sua suplementação (DBR<sub>22</sub>)

Estas dietas foram confeccionadas no laboratório. Os alimentos listados nas Tabelas 2 e 3, foram cozidos, secados em estufa (60-70°C), moídos (exceto a farinha de mandioca), e misturados nas proporções definidas nas mesmas Tabelas. Em seguida, foram transformados em pelotas e secos, novamente, em estufa (60-70°C).

## 7.2 Modelo comportamental de inibição latente (LI)

Aos 75-85 dias de vida, 108 animais que receberam as três diferentes dietas (n=36 em cada um dos 3 grupos nutricionais) foram, inicialmente, submetidos às fases do procedimento da LI. Vinte minutos antes de iniciar o modelo de LI, cada grupo nutricional foi dividido em 2 grupos, respectivamente injetados *ip.*, com: 1) salina (SAL, n=18 em cada um dos 3 grupos nutricionais) ou 2) cafeína (CAF, n=18) na dose de 30 mg/kg. Em seguida, os grupos Sal ou CAF foram subdivididos em **pré-expostos** (CS – grupos **PE**, n=9 em cada um dos 3 grupos nutricionais) ou **não pré-expostos** a solução de sacarose a 5% à água (**NPE**, n=9 - Figura 1). O grupo NPE recebeu água em lugar da sacarose. Em todas as fases do experimento comportamental (LI), os animais foram privados de água por aproximadamente 23 h, como descrito abaixo.

**TABELA 4 - Composição da dieta “Labina” (Purina do Brasil)\* .**

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

**ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO**

Vitamina A .....	20.000 UI
Vitamina D3 .....	6.000
Vitamina E .....	30 UI
Vitamina K .....	6 mg
Vitamina B12 .....	10 mcg
Vitamina B .....	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**

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

\*segundo Purina do Brasil.

### 7.2.1 Equipamento.

Foram utilizadas caixas experimentais de acrílico (23,5X35,5X40 cm) contendo dois orifícios, através dos quais os animais tiveram acesso a dois bicos de aço inox. Esses bicos foram conectados a garrafas de vidro, com graduação em ml, contendo solução de sacarose ou água.

### 7.2.2 Procedimento.

O procedimento usado neste trabalho teve como base a aversão gustativa condicionada descrita por TURGEON *et al.* (2000). Este procedimento é composto de três fases:

*Pré-exposição* (dias 1, 2 e 3) -- Duração de 3 dias. Antes de dar início às sessões de pré-exposição, os animais, como mencionado acima, foram divididos em pré-expostos (PE) e não pré-expostos (NPE) à sacarose como estímulo neutro. Todos os animais estavam privados de água por aproximadamente 23 h. Nesta primeira fase, os animais foram colocados individualmente nas caixas experimentais por 30 minutos. Nesse período tiveram à disposição um bebedouro graduado em ml, contendo 50 ml de solução de sacarose a 5% (grupo PE) ou com 50 ml de água (NPE). Ao completarem os 30 min, os ratos foram recolocados em suas gaiolas onde ficaram sem água até o dia seguinte. Finalizada cada sessão de pré-exposição, a quantidade de solução de sacarose ou água consumida foi registrada.

*Condicionamento* (dia 4) – Nessa 2<sup>a</sup> fase, todos os animais tiveram livre acesso a 50 ml de solução de sacarose por 30 min, após terem sido colocados nas caixas experimentais. Imediatamente após os 30 min, os animais receberam uma injeção de 50 mg/kg/ml, *ip.*, de LiCl. Os sujeitos retornaram ao biotério 5 min após a injeção e nele ficaram sem água por 23 h. A quantidade de solução de sacarose consumida foi registrada no término desta fase.

*Teste* (dia 5) – Nesta última fase, todos os animais foram colocados na caixa experimental, com dois bebedouros de vidro, um contendo 50 ml de solução de sacarose e o outro contendo 50 ml de água por 30 min. Finalizada esta sessão, os volumes de sacarose e água consumidos foram registrados. A LI foi avaliada através do grau de supressão à solução

de sacarose entre os animais do grupo PE e NPE. O grau de supressão à sacarose foi medido usando o cálculo da “razão de supressão à sacarose” RSS.

$$\text{RSS} = \frac{\text{ml de sacarose consumida}}{(\text{ml de sacarose} + \text{ml de água consumidas})}$$

Em um determinado grupo, a RSS com valor  $>0,50$  mostra que houve maior consumo de sacarose do que de água, no dia do teste. Se os valores da RSS forem  $<0,50$  significa que houve maior consumo de água em relação à sacarose. Dentro de uma mesma condição de tratamento, conclui-se que ocorreu inibição latente quando a RSS dos animais NPE for significantemente menor do que a daqueles na situação PE.

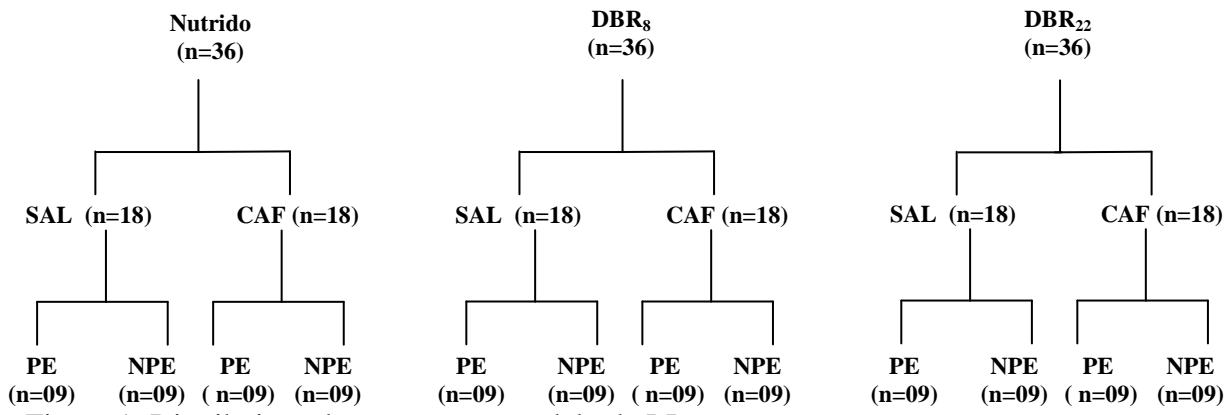


Figura 1: Distribuição dos grupos no modelo de LI

### 7.3 O fenômeno eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC)

Um grupo de 31 animais, nas três condições nutricionais (9 ratos nutridos, 10 DBR<sub>8</sub> e 12 DBR<sub>22</sub>), que passaram pela LI (receberam intraperitonealmente injeção de cloreto de lítio), foram estudados aos 90-110 dias com relação aos efeitos do lítio sobre a DAC (artigo 1). Como grupos controles, foram comparados a 34 animais (13 nutridos, 10 DBR<sub>8</sub> e 12 DBR<sub>22</sub>), que passaram pelos mesmos procedimentos, mas não receberam cloreto de lítio.

No outro artigo (artigo 2), os 34 ratos controle acima descritos foram também estudados quanto ao efeito da administração de cafeína sobre a DAC. Nesses animais, como dito anteriormente, comparou-se as velocidades de propagação da DAC antes e depois da administração da cafeína.

### 7.3.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo Uretana a 10% e Cloralose a 0,4% (1.000 mg/Kg e 40 mg/kg, respectivamente), na dose de 1 ml de solução/ 100 g de peso do animal, por via intraperitoneal (*ip.*). Em seguida, os animais foram colocados em decúbito ventral, sobre um aquecedor elétrico, sendo a temperatura retal monitorada continuamente e mantida a  $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . A cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico (modelo 900, David Kopf). Em seguida, foi feita uma incisão na cabeça ao nível da linha média, expondo o periôsteo da calota superior, onde foram feitos 3 orifícios circulares, usualmente ao nível do hemisfério direito. O primeiro orifício (com aproximadamente 2 mm de diâmetro) foi feito na região do osso frontal, e foi utilizado para deflagrar a DAC, mediante estimulação de um ponto cortical. Os outros dois orifícios (de aproximadamente 3 mm de diâmetro) foram feitos no osso parietal, e foram usados para a colocação de dois eletrodos, os quais permitiram o registro eletrofisiológico da DAC.

### 7.3.2 Estimulação cortical

A DAC foi provocada, a intervalos de 20 minutos, através de estimulação química (aplicação a um ponto da superfície cortical durante 1 minuto, de uma bolinha de algodão, com 1 a 2 mm de diâmetro embebido em uma solução de KCl a 2%). O registro da DAC teve a duração de 4h.

Com o procedimento de estimulação na região frontal, provocou-se usualmente uma única "onda" de DAC que, ao se propagar, foi registrada pelos 2 eletrodos colocados na região parietal. Nos casos eventuais em que um episódio de DAC apareceu sem ter havido estimulação intencional com KCl (chamada DAC "espontânea"), aguardou-se 20 minutos a partir da DAC espontânea para realizar nova estimulação com KCl.

### 7.3.3 Registro Eletrofisiológico

Os registros da Atividade Elétrica Cortical (Eletrocorticograma; ECoG) e da variação lenta de voltagem (VLV) que acompanha a DAC foram realizados em 2 pontos da superfície

do córtex parietal, por um período de 4 horas. Para tal, utilizamos 3 eletrodos (2 para o registro, nos orifícios do osso pariental e 1 para referência comum, sobre o osso nasal). Esses eletrodos foram do tipo “prata-cloreto de prata”, obtidos através da deposição, por eletrólise, de uma fina camada de cloreto de prata em um delgado fio do mesmo metal. Os fios de prata assim cloretados foram inseridos em pipetas de plástico, (5 cm de comprimento, diâmetro inferior de 1mm e superior de 5mm) cheias com solução de Agar-Ringer a 0,5%. Em seguida, duas destas pipetas foram fixadas entre si por cola de ciano-acrilato, formando um par, cuja distância entre as pontas é fixa e conhecida. Este par de pipetas foi fixado em uma haste de madeira, a qual foi presa em um sistema de alavanca. Esta era acionada pelo avanço e recuo de um parafuso, realizando movimentos verticais dos eletrodos, permitindo, assim, a sua colocação na superfície cortical de forma suave, sem pressão excessiva.

Os registros foram realizados utilizando-se dois polígrafos, sendo um da marca “Grass” (modelo 7D, Grass Medical Instruments) e o outro da marca “Ugo Basile”.

O cálculo da velocidade de propagação da DAC foi feito dividindo-se a distância entre os dois eletrodos de registro (distância fixa para cada experimento) pelo tempo gasto para que uma onda da DAC possa percorrer esta distância.

#### **7.4 Peso corporal**

Os animais foram pesados em balança eletrônica marca “Filizola”, dos 3 aos 75 dias de vida. Essa medida teve como objetivo principal avaliar o impacto das manipulações nutricionais (DBR<sub>8</sub> e DBR<sub>22</sub>) sobre o desenvolvimento do animal.

#### **7.5 Drogas**

A Cafeína (1,3,7-trimetilxantina – C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – DEG Importação de Produtos Químicos) foi dissolvida em água destilada, aquecida a aproximadamente 70°C e administrado por via intraperitoneal. Todos os animais, de ambos os grupos PE e NPE, foram injetados com uma dose de 30 mg/kg/ml de cafeína 20 min antes das fases de Pré-exposição e Condicionamento da LI. Nos experimentos da DAC, a cafeína foi administrada ao final da segunda hora de registro.

O Cloreto de Lítio (LiCl – Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água destilada e

administrado por via intraperitoneal. Nos experimentos da LI, todos os animais, de ambos os grupos PE e NPE, foram injetados com uma dose de 50 mg/kg/ml de LiCl, imediatamente após 30 min de livre acesso à solução de sacarose no dia do condicionamento (dia 4).

### **7.6 Análise dos resultados**

Posteriormente, os resultados foram analisados através da ANOVA e teste *post hoc* (Holm Sidak), quando indicado. Nos experimentos da DAC do segundo artigo, o efeito da cafeína foram avaliados comparando-se as velocidades de propagação da DAC nos períodos pré- e pós-cafeína, por meio do teste t pareado. Foram consideradas significantes as diferenças em que  $p \leq 0,05$ .

## **8. RESULTADOS**

Como apresentado anteriormente, nesta tese investigou-se, em ratos wistar, os efeitos cerebrais da interação entre o fator nutrição (labina, DBR<sub>8</sub> e DBR<sub>22</sub>), manipulado no período crítico do desenvolvimento cerebral (nascimento ao 25º dia de vida), e o fator tratamento com as drogas cafeína e/ou lítio. Foram estudados dois fenômenos: um, comportamental (LI) e o outro, eletrofisiológico (DAC).

Os resultados geraram dois artigos científicos originais que foram submetidos a revistas especializadas de circulação internacional.

O primeiro artigo deste estudo é intitulado: “**Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats**”. Ele foi submetido à revista “Nutritional Neuroscience” (Anexo B), que explora a área representada pela interface nutrição-neurociências.

O segundo artigo deste estudo foi titulado: “**Caffeine impairs latent inhibition, but not spreading depression in malnourished rats**”, foi submetido à revista Physiology & Behavior (Anexo C).

A seguir estão apresentados os referidos artigos na versão original em que foram submetidos para as revistas.

**ARTIGO no.1****Title:**

Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats

**Authors:**

Márlison José Lima de Aguiar<sup>1</sup>, Cilene Rejane Ramos Alves de Aguiar<sup>2</sup>, Rubem Carlos Araújo Guedes<sup>1, CA</sup>.

**Addresses:**

<sup>1</sup>*Dept. of Nutrition, Univ. Federal de Pernambuco, 50670901 Recife, Brazil*

<sup>2</sup>*Dept. of Psychology, Univ. Federal de Pernambuco, 50670901 Recife, Brazil*

**CA** = Corresponding author; address <sup>(1)</sup> as above

e-mail: [rguedes@ufpe.br](mailto:rguedes@ufpe.br)      or      [rc.guedes@terra.com.br](mailto:rc.guedes@terra.com.br)

## Abstract

Lithium salts exert electrophysiological and behavioral effects in animals and humans and have been used clinically in the treatment of bipolar disorders. Little is known about the lithium/nutrition interaction in the developing brain. This work aimed to determine, in adult rats, whether treatment with a single dose of lithium chloride would influence the propagation of the brain excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). Male well-nourished (W; fed a lab chow diet with 22% protein; n=22) and previously protein-malnourished rats (M; fed a low-quality 8% protein diet; proteins mostly from vegetable source; n=20) were treated at 75-80 days of age with a single intraperitoneal injection of either 50 mg/kg LiCl (n= 9 W and 10 M rats) or saline (n=13 W and 10 M rats). When the pups were 90–110 days, CSD was elicited at the frontal cortex and recorded during 4h at two cortical parietal points. In malnourished, but not in well-nourished rats, lithium treatment lowered CSD velocities ( $P<0.05$ ), in comparison with saline injected animals. In a third group (n=23), in which the low-protein diet was quantitatively corrected to 22%, the lithium effect disappeared (n=12), compared to saline (n=11). Our results demonstrate a facilitating effect of malnutrition on the CSD-impairing action of a single lithium administration, suggesting a lithium/nutrition interaction.

## Introduction

Lithium has largely been used in the control of bipolar disorders (<sup>1</sup>) and has been able to influence morphological, behavioral and molecular features in the brain (<sup>2, 3</sup>). When associated with the convulsing drug pilocarpine, a single lithium administration can also influence brain excitability, intensifying the pilocarpine-induced seizures (<sup>4</sup>).

Several grains and vegetables consumed by humans, as well as drinking water, can eventually supply the organism with significant amounts of the element via diet intake (<sup>5, 6</sup>) and some studies suggest an inverse relationship between lithium concentration in tap water and the rates of mental hospital admission and homicide (<sup>7</sup>). The kidneys and the brain are the organs that retain more lithium, as compared with other organs (<sup>6</sup>).

Concerning the action of substances such as lithium on brain excitability, significant effects can be investigated by means of electrophysiological analyses, employing the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD; <sup>8</sup>). This phenomenon has been electrophysiologically characterized by a reversible and slowly propagating “wave” of reduction of spontaneous and evoked cortical electrical activity, with a simultaneous DC slow potential change of the tissue (<sup>9, 10</sup>). CSD has also been undoubtedly documented in the brain of neurological patients (<sup>11, 12</sup>). The appearance of epileptiform-like waves during CSD (while the spontaneous activity is reduced) suggests a possible relationship between brain excitability changes and CSD (<sup>9</sup>). This relationship has been experimentally investigated using environmental, pharmacological, genetic and nutritional paradigms (<sup>13-16</sup>). In general, the results indicate that CSD propagation in the cortical tissue can be modified by clinically relevant conditions known to influence brain excitability. Measuring CSD velocity of propagation along the cortical tissue is a reasonable and easy way of estimating the brain CSD susceptibility.

Concerning the neural effects of nutritional factors, it is well known that protein malnutrition can affect the developing brain, altering its electrophysiological activity (<sup>17, 18</sup>). It has been also well established that early malnutrition increases CSD propagation (<sup>19, 20</sup>). The same is true for the administration of substances like the amino acids L-arginine (<sup>21</sup>) and L-glutamine (<sup>22</sup>), and the pyrazolone-derived, non-steroidal antipyretic/analgesic/anti-inflammatory drug dipyrone (<sup>23</sup>). In contrast, it was demonstrated in adult rats that lithium administration through the diet for 15 days decreased CSD propagation as compared with rats receiving a lithium-free diet (<sup>24</sup>). No information is available however, regarding the treatment

with a single dose of lithium. Thus, the aim of the present study was to investigate such possible effect on CSD propagation in well-nourished and early-malnourished adult rats.

## Methods

Experiments were carried out in accordance with the “Principles of laboratory Animal Care” (National Institutes of Health Bethesda USA) and were approved by the Ethics Committee for Animal research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, where the experiments have been conducted. Male Wistar rats ( $n= 65$ ) from the colony of our Department were used. They constituted three different nutritional groups, one well-nourished, suckled by dams fed a commercial lab-chow diet from Purina® Brazil Ltd with 22% protein (C;  $n= 22$ ), and two malnourished groups, suckled by dams fed the “basic regional diet” (BRD; Table I), made with the foodstuffs that constituted the “basis” of the daily meals of human populations of Northeast region of Brazil (25). The two BRD groups differed in the quantity, but not in the quality of protein in the dams’ diets: in one BRD group the dams received the BRD with 8% protein (group BRD<sub>8</sub>;  $n=20$ ) and in the other, BRD with 22% protein (group BRD<sub>22</sub>;  $n=23$ ). For a note on the pros and cons of using BRD, the reader is referred to Picanço-Diniz et al (26). When the pups were 75-80 days-old, they were intraperitoneally injected, on a single basis, with either saline (13 well-nourished, 10 BRD<sub>8</sub> and 11 BRD<sub>22</sub> rats) or with 50 mg/kg Lithium chloride (9 well-nourished, 10 BRD<sub>8</sub> and 12 BRD<sub>22</sub> rats). The animals were housed in 51 cm x 35.5 cm x 18.5 cm polypropylene cages, in a room with a light-dark cycle (12/12h; lights on at 6 a.m.) and temperature of 22±1°C. Body weights of the animals were measured on days 3, 10, 22, 25, 35, 45, 55 and 75. When the animals were 90 to 110 days old, they were submitted to CSD recording for a 4-hour period. Under anesthesia (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, ip), three trephine holes (2–3 mm in diameter) were drilled on the right side of the skull (two at the parietal bone and one at the frontal bone). The three holes were aligned in the antero-posterior direction and were also parallel to the midline. CSD was elicited at 20 min intervals by applying a cotton ball (1–2 mm diameter), soaked in 2% KCl solution (approximately 0.27 M) to the anterior hole drilled at the frontal region for 1 min. Once elicited, the propagating CSD was monitored simultaneously at two parietal points on the cortical surface by recording the electrocorticogram (ECoG) depression and the slow DC potential change typical of CSD. Recordings were performed by using a pair of Ag-AgCl agar-Ringer electrodes. These electrodes consisted of plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter), filled

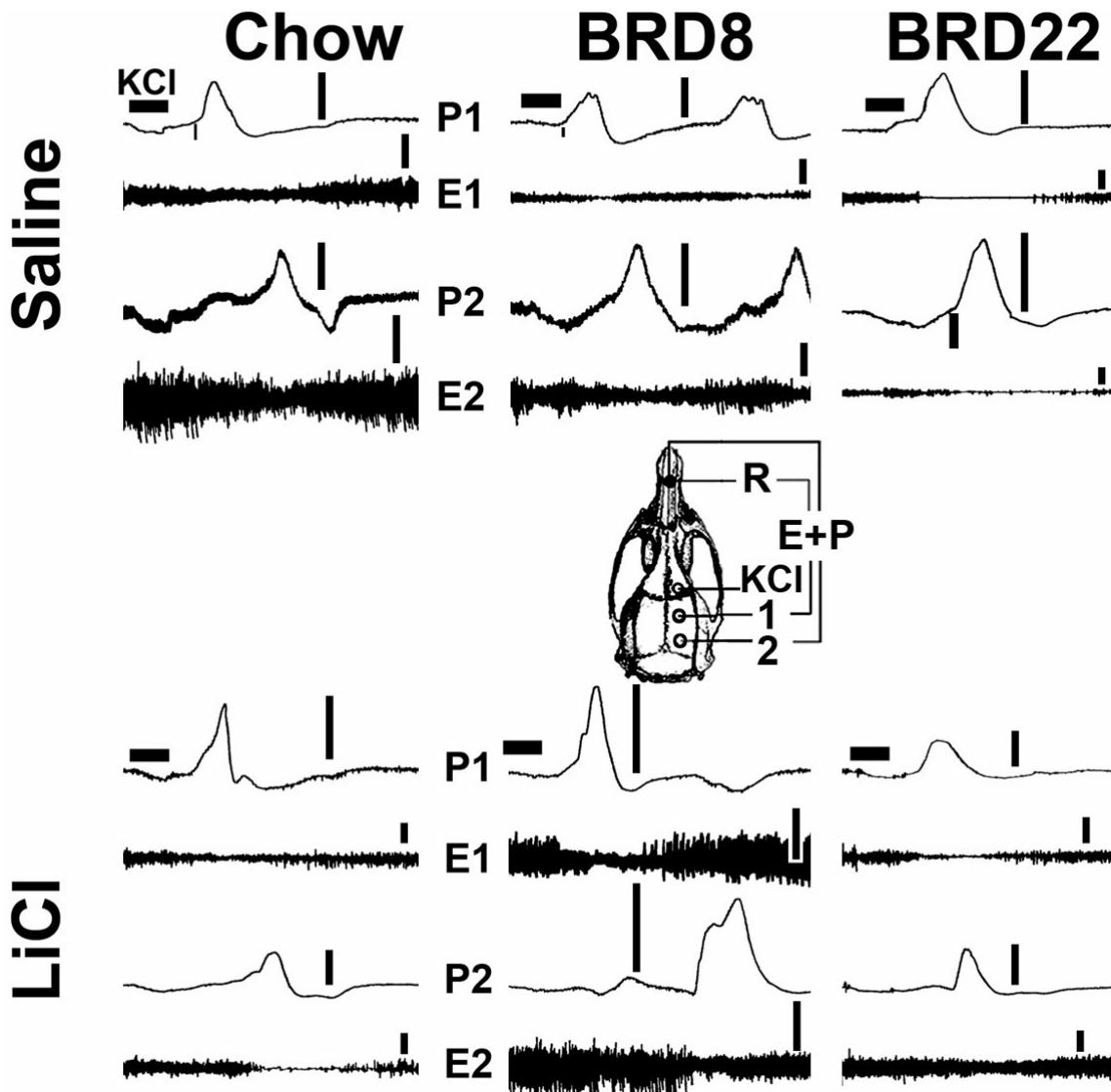
with Ringer solution solidified with the addition of 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. The pipettes were fixed together pair-wise with cyanoacrylate glue, so that the interelectrode distance was kept constant for each pair (range: 4–5.5 mm). Each pair of electrodes was connected to a lever that could be vertically moved by turning around a screw, so that the recording electrodes could be gently placed on the intact dura-mater, under low-power microscope control, without any excessive pressure on the cortical surface. A common reference electrode, of the same type, was placed on the nasal bones. The velocity of CSD propagation was calculated based on the time required for a CSD wave to cross the distance between the 2 recording electrodes. In the measurement of CSD velocities, the initial point of each DC negative rising phase was used as the reference point. During the recording session, rectal temperature was maintained at  $37\pm1$  °C by means of a heating blanket. After the recording session was terminated the animal, while anesthetized, was submitted to euthanasia by bulbar injury. This was carried out by introducing a sharp needle into the *cisterna magna*, provoking immediate cardio-respiratory arrest.

### Statistics

Intergroup body weight differences were compared using a one-way ANOVA followed by the Duncan test. CSD propagation velocities were compared by using a 3x2 ANOVA, including as factors nutritional status (Well-nourished, Malnourished 8% protein and Malnourished 22% protein) and drug treatment (saline and Lithium Chloride). This was followed by a post hoc (Tukey–Kramer) test, where indicated. Differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ .

## Results

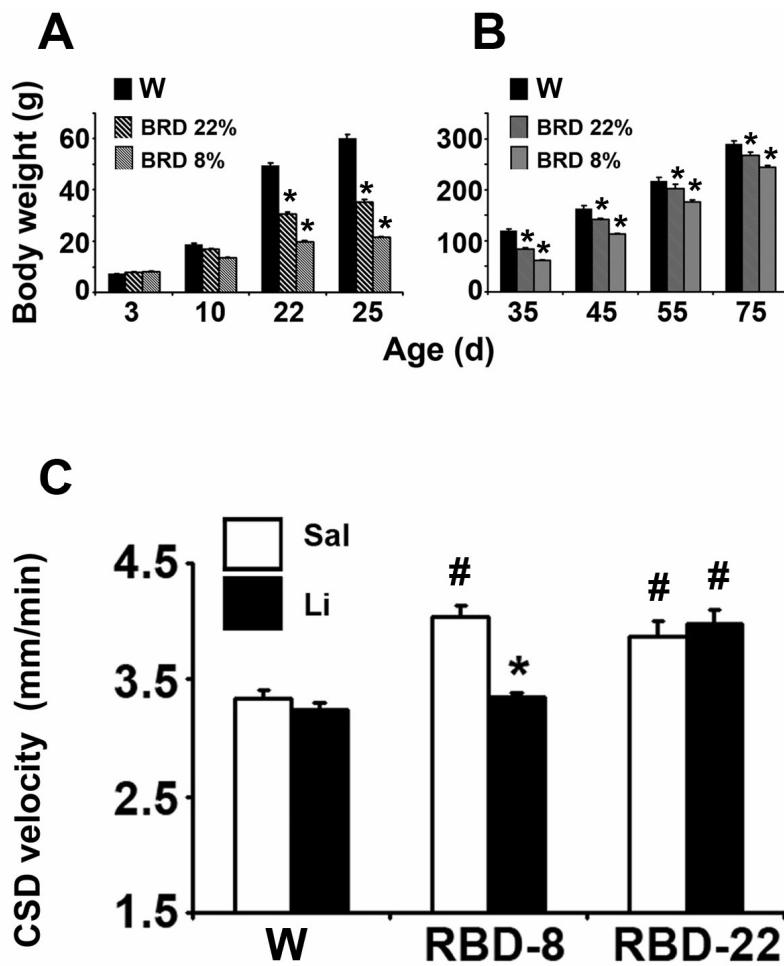
As shown in Figure 1, application of 0.27 M KCl for 1 min to a point of the frontal cortical surface was effective in eliciting a CSD episode, which propagated and was recorded at the two parietal recording points (shown in the inset of the figure). In the BRD<sub>8</sub> group, in some cases the KCl stimulation elicited more than one CSD episode (shown in the center-upper part of Figure 1), suggesting a higher cortical susceptibility to the CSD-phenomenon.



**Figure 1-** Electrocorticogram (E) and slow potential change (P) of cortical spreading depression (CSD) in two well-nourished (left part of the figure) and four early-malnourished rats, respectively fed a balanced 22% protein chow diet, or the imbalanced “Regional Basic Diet” (BRD) containing either 8% protein (center part of the figure) or 22% protein (right part) mostly from vegetable source. Three of the animals – one in each nutritional condition- were intraperitoneally injected with saline (three upper panels) and the other three with a single dose of 50 mg/kg lithium chloride (lower panels). The skull drawing shows the KCl stimulation point (where CSD was elicited) and the recording positions 1 and 2, as well as the position of the common reference electrode (R). The horizontal black bars in the P1-traces indicate the period (1 min) in which KCl stimulation was applied to the frontal region of the same hemisphere. Vertical bars correspond to 10 mV in P and 1 mV in E (negative upwards). The velocity of CSD propagation was calculated based on the time required for a CSD wave to cross the distance between the 2 recording points. In this case, the interelectrode distance was 4.0 mm in all animals.

Figure 2-A and B show the weight reduction in the two BRD groups, as compared to the well-nourished group, indicating the effectiveness of the malnutrition paradigm. ANOVA showed a significant main effect of nutritional status on the body weight ( $F[2,440] = 177.24$ ;  $P < 0.001$ ).

CSD velocities of propagation are shown in Figure 2-C. In the lithium-free animals (groups injected with saline; white bars) the mean CSD velocities in mm/min were  $3.39 \pm 0.26$ ,  $4.04 \pm 0.32$  and  $3.86 \pm 0.49$  for the control, BRD<sub>8</sub> and BRD<sub>22</sub>, respectively. ANOVA indicated intergroup differences and *post-hoc* comparisons showed that the velocities were higher in the two early-malnourished groups, as compared to the well-nourished controls ( $F[2, 62] = 20.43$ ;  $P < 0.001$ ), indicating the facilitating effect of malnutrition on cortical susceptibility to CSD. Lithium treatment was associated with a significant CSD-velocity reduction in the BRD<sub>8</sub>, but not in the BRD<sub>22</sub> or well-nourished rats (black bars in Figure 2-C), as compared to the corresponding saline groups. The mean CSD velocities in mm/min for the lithium-injected well-nourished, BRD<sub>8</sub> and BRD<sub>22</sub> groups were respectively  $3.25 \pm 0.13$ ,  $3.35 \pm 0.13$  and  $3.98 \pm 0.43$  ( $F[1, 63] = 7.080$ ;  $P < 0.01$ ).



**Figure 2-** Body weights (panels A and B) and CSD velocity of propagation (panel C) of well-nourished (W) and early-malnourished rats, respectively fed a balanced 22% protein chow diet, or the imbalanced “Basic Regional Diet” (BRD) containing either 8% protein (group BRD<sub>8</sub>) or 22% protein (group BRD<sub>22</sub>) mostly from vegetable source. The panel A shows the body weights measured on postnatal days 3, 10, 22, 25 and the panel B shows the weights on days 35, 45, 55 and 75 (note the scale change). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Asterisks in panels A and B indicate RBD-values significantly different from the age-matched well-nourished controls. Asterisk in panel C denotes a significantly lower CSD propagation velocity in the RBD<sub>8</sub> lithium-treated group as compared to the corresponding saline-treated animals ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

The main finding of the present study was that a single dose of lithium chloride decreased CSD susceptibility in the severely early-malnourished BRD<sub>8</sub> group (fed the 8% protein diet), but not in the well-nourished or in the BRD<sub>22</sub> groups (both fed 22% protein diets), as indexed by the CSD propagation velocities. This can be interpreted as a malnutrition-related amplification of the lithium effect on CSD propagation, which to our knowledge represents a novel lithium/nutrition interaction on the CSD in the rat brain, as recently demonstrated for another drug (<sup>23</sup>).

### *Lithium and brain function*

An extensive body of data documents the various actions of lithium on nervous system of the mammal organism (<sup>27</sup>). At the molecular level, lithium is involved in multiple pathways which can result in inhibition of inositol-1-monophosphatase, and inhibition of glycogen synthase kinase-3β (<sup>3, 28, 29</sup>). This last action results in the accumulation of β-catenin and β-catenin-dependent gene transcriptional events (<sup>30</sup>). The lithium-induced upregulation of neurotrophins such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has also been demonstrated in laboratory animals (<sup>27</sup>). Morphologically, lithium has been associated with attenuation of stress-induced structural dendritic remodeling in the amygdala (<sup>2</sup>). A lithium-related protection against the effects of excitotoxic drugs has been suggested in behavioral (<sup>31</sup>), as well as in *in vitro* studies (<sup>32</sup>). Concerning the lithium effects on brain electrophysiological properties, contradictory results have been reported, suggesting either proconvulsive or anticonvulsive action (<sup>4, 33</sup>). Recent findings have demonstrated in the rat that a single intraperitoneal administration of lithium reduced REM sleep affecting autonomic activity and brain second messengers (<sup>34</sup>). The present findings on CSD propagation changes represent another evidence of the brain effect of a single lithium application in adult rats. Whether the above-commented molecular- morphological- and behavioral lithium effects are also involved in the CSD changes of our lithium-treated early-malnourished rats remains to be clarified.

### *Lithium/Nutrition interaction on CSD*

We suggest that early protein-deficiency rendered the rat brain more susceptible to the antagonistic action of lithium on CSD propagation. This suggestion is supported by our

findings that lithium treatment significantly lowered CSD velocities in the malnourished, but not in the well-nourished rats. Interestingly, Jones et al (<sup>34</sup>) found that while a single lithium administration significantly affected REM sleep, it produced only a non-significant reduction in the delta power density of the EEG in NREM sleep.

As previously demonstrated (<sup>19, 20</sup>) – and presently confirmed – malnutrition early in life facilitates CSD propagation. It has been postulated that this CSD facilitation is dependent, at least in part, on the following three neural consequences on early malnutrition: (1) increase in the brain cell packing density, (2) imbalance in the action of synaptic neurotransmitters and (3) reduction in brain myelination. These nutrition-related alterations (<sup>17, 18</sup>) are considered of relevance for the present study on the basis of experimental data (<sup>20</sup>). In addition, it is pertinent to mention that recently Merkler et al (<sup>16</sup>), by using dietary, genetic (transgenic animals) and immunohistochemical approaches, clearly demonstrated an inverse correlation between brain myelination and CSD propagation; such effect was shown to be modulated dichotomously, i.e., CSD was accelerated in myelin-deficient and decelerated in hypermyelinated animals. A similar dichotomous CSD modulation has also been reported by Rocha-de-Melo et al (<sup>20</sup>) in adult rats under conditions of early malnutrition (accelerated CSD propagation; rats suckled in large litters with 12 pups per dam) and hypernutrition (decelerated CSD; litters containing only 3 pups), as compared to eutrophic, normally suckled control rats (litters with 6 pups). Early malnutrition and hypernutrition are conditions that in all probability render the brain respectively myelin-deficient and hypermyelinated (<sup>17, 18</sup>).

As we have previously demonstrated in laboratory animals, drugs used with therapeutic purposes in neurological diseases present distinct effectiveness as a function of the nutritional status of the organism (<sup>23, 35, 36</sup>). In line with the above evidence, we found that early malnutrition enhanced the antagonistic effects of lithium on CSD. These findings collectively indicate that the responsiveness of the CSD to distinct compounds may not be the same for all types of pharmacological substances. This raises some concerns regarding neural actions of distinct drugs if the present CSD effects, observed in rats, could be extrapolated to the human species. One possible therapeutic implication would be that such substances could be differentially effective as a function of the early nutritional status of the patients. We strongly recommend the investigation of this possibility in clinical studies.

Another interesting result of the present study was that the CSD impairing action of a single lithium administration, observed in early-malnourished adult rats, could be abolished by increasing the quantity (from 8% to 22%) of the BRD protein without improving its quality (Figure 2-C; group BRD<sub>22</sub>). One interpretation that might originate from this is that the diet

BRD<sub>22</sub> improved myelination in an extent sufficient to abolish the increased CSD propagation velocity seen in the BRD<sub>8</sub> group. This would be in line with the findings from Merkler et al (16), concerning the inverse correlation between CSD propagation and the myelin content of the brain. All the evidence notwithstanding, we believe that future experiments in which the myelin content of the brain will be measured in the BRD<sub>22</sub> condition are required to definitely validate our postulation.

In summary, this study demonstrates that being suckled by dams feeding a low-protein diet early in life significantly enhances the impairing effect of a single lithium intraperitoneal administration on CSD propagation, and this effect disappeared by increasing the quantity, without improving the quality of the maternal dietary protein during the lactation period. The results suggest an interaction between lithium and the nutritional status during brain development and might help in the understanding of the interaction between pharmacological and nutritional factors, in the modulation of neurophysiologic phenomena.

#### Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CAPES, CNPq, MS-SCTIEDECIT (No.17/2006), Facepe and IBN-Net (No. 4191) for financial support. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 307846/2004).

## References

1. Geddes JR, Burgess S, Hawton K *et al.* Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Psychiat* 2004; **161**: 217–222.
2. Johnson SA, Wang JF, Sun X *et al.* Lithium treatment prevents stress-induced dendritic remodeling in the rodent amygdala. *Neuroscience*. 2009; **163**: 34-39.
3. O'Brien WT, Harper AA, Jové F *et al.* Glycogen Synthase Kinase-3-Beta Haploinsufficiency Mimics the Behavioral and Molecular Effects of Lithium. *J Neurosci* 2004; **24**: 6791–6798.
4. Han S-R, Shin C, Park S *et al.* Differential Expression of Activating Transcription Factor-2 and c-Jun in the Immature and Adult Rat Hippocampus Following Lithium-Pilocarpine Induced Status Epilepticus. *Yonsei Med J* 2009; **50**: 200-205.
5. Weiner ML. Overview of lithium toxicology. In: Schrauzer GN, Klippe KF, eds. "Lithium in Biology and Medicine." Weinheim: VCH Verlag, 1991: pp 83–99.
6. Schrauzer GN. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *J Am Coll Nutr* 2002; **21**: 14-21.
7. Dawson EB (1991). The relationship of tap water and physiological levels of lithium to mental hospital admission and homicide in Texas. In: Schrauzer GN, Klippe KF, eds: "Lithium in Biology and Medicine." Weinheim: VCH Verlag, 1991: pp 171–187.
8. Guedes RCA. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience. In: Liebermann H, Kanarek R, Prasad C. (eds) *Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field*. New York: CRC Press, 2005; 39–54.
9. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; **7**: 359–390.
10. Leão, A.A.P. (1947). Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1947; **10**: 409-414.
11. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M *et al.* Co-Operative Study of Brain Injury Depolarisations (COSBID). Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 2008; **63**: 720–728.
12. Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L *et al.* Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol* 2008; **119**: 1973–1984.

13. Amâncio-dos-Santos A, Pinheiro PCF, Lima DSC *et al.* Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Exp Neurol* 2006; **200**: 275-282.
14. Costa-Cruz RRG, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RCA. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett* 2006; **401**: 271-275.
15. Fregni F, Liebetanz D, Monte-Silva KK *et al.* Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Exp Neurol* 2007 **204**: 462-466.
16. Merkler D, Klinker F, Jürgens T, *et al.* Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann Neurol* 2009; **66**: 355-365.
17. Morgane PJ, Miller M, Kemper TS *et al.* The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1978; **2**: 137–230.
18. Morgane PJ, Austin-Lafrance R, Bronzino J *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; **17**: 91–128.
19. De Luca B, Cioffi A, Bures F. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activ Nerv Sup* 1977; **19**: 130–131.
20. Rocha-de-Melo AP, Cavalcanti JB, Barros AS *et al.* Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr Neurosci* 2006; **9**: 155–160.
21. Frazão MF, Maia LMSS, Guedes RCA. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. *Neurosci Lett* 2008; **447**: 26-30.
22. Lima DSC, Maia LMSS, Barboza EA *et al.* L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. *Life Sci* 2009; **85**; 241-247.
23. Amaral APB, Barbosa MSS, Souza VC *et al.* Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. *Exp Neurol* 2009; **219**:492-498.
24. Guedes RCA, Amorim LF, Medeiros MC *et al.* Effect of Dietary Lithium on Cortical Spreading depression. *Braz J Med Biol Res* 1989; **22**: 923-925.

25. Teodosio NR, Lago ES, Romani SAM *et al.* A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam. Nutr* 1990; **40**: 533-547.
26. Picanço-Diniz CW, Araujo MS, Borba JMC *et al.* NADPHdiaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr Neurosci* 1998; **1**: 35-48.
27. Young W. Review of Lithium Effects on Brain and Blood. *Cell Transplant* 2009; *in press*.
28. Berridge MJ. Inositol trisphosphate, calcium, lithium and cell signaling. *JAMA* 1989; **262**: 1834-1841.
29. Nahorski SR, Jenkinson S, Challiss RAJ. Lithium-induced disruption of cell signaling in brain: evidence implicating the phosphoinositide cycle, *Pharmacol. Toxicol.* 1992; **71**: 42-48.
30. Wada A. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades. *J Pharmacol Sci.* 2009; **110**: 14-28.
31. Pascual T, Gonzalez JL. A protective effect of lithium on rat behaviour altered by ibotenic acid lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Brain Res* 1995; **695**: 289-292.
32. Hashimoto R, Hough C, Nakazawa T *et al.* Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *J Neurochem* 2002; **80**: 589-597.
33. Julius SC, Brenner RP. Myoclonic seizures with lithium. *Biol Psychiat* 1987; **22**: 1184-1190.
34. Jones CA, Perez E, Amici R *et al.* (2008) Lithium affects REM sleep occurrence, autonomic activity and brain second messengers in the rat. *Behav Brain Res* 2008; **187**: 254-261.
35. Guedes RCA, Cabral-Filho JE, Teodosio NR. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats. In: Do Carmo RJ. (ed) *Spreading Depression*. Berlin: Springer, 1992; 17-26.
36. Vasconcelos CAC, Oliveira JAF, Costa LAO *et al.* Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single subconvulsing dose of pilocarpine. *Nutr Neurosci* 2004; **7**: 163-170.

**ARTIGO no. 2****Title:**

Caffeine impairs latent inhibition, but not spreading depression in malnourished rats

**Authors:**

Márlison José Lima de Aguiar<sup>1</sup>, Cilene Rejane Ramos Alves de Aguiar<sup>2</sup>, Rubem Carlos Araújo Guedes<sup>1, CA</sup>.

**Addresses:**

<sup>1</sup>*Dept. of Nutrition, Univ. Federal de Pernambuco, 50670901 Recife, Brazil*

<sup>2</sup>*Dept. of Psychology, Univ. Federal de Pernambuco, 50670901 Recife, Brazil*

**CA** = Corresponding author; address <sup>(1)</sup> as above

e-mail: [rguedes@ufpe.br](mailto:rguedes@ufpe.br)      or      [rc.guedes@terra.com.br](mailto:rc.guedes@terra.com.br)

## Abstract

Caffeine, like malnutrition, can produce behavioral and electrophysiological alterations, but the interaction of both factors has not been much studied. Here this interaction has been studied in male Wistar rats previously malnourished during the lactation period by feeding their dams the so-called “regional basic diet” of Northeast Brazil, containing about 8% protein, predominantly from vegetable source (RBD<sub>8</sub>). At 70-75 days of life part of the pups were ip-treated with 30 mg/kg caffeine for 4 days while tested in the behavioral model of latent inhibition (LI). Another group was submitted to the electrophysiological recording of the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD), and the effects of caffeine injected during the recording session was evaluated. Caffeine did not affect CSD, but antagonized LI in both the RBD<sub>8</sub>-malnourished rats and in a well-nourished (W) control group (fed a chow diet with 22% protein). This behavioral effect of caffeine was not seen in another malnourished group fed a protein-supplemented RBD (protein content increased to 22% by increasing the proportion of the same foodstuffs from vegetable origin; RBD<sub>22</sub> group), suggesting an interaction between caffeine and dietary protein content. The results indicate a differential effect of caffeine in the LI behavioral model, as compared to the CSD phenomenon, and this effect is influenced by the early nutritional status of the animal. We suggest the involvement of caffeine modulation of dopaminergic subcortical receptors participating in attention processes, and absence of such involvement at the cortical level, in view of the lack of effect in the CSD.

**Key words:** Protein-malnutrition; Caffeine; Attention behavior; Latent inhibition; Cortical spreading depression

## Introduction

The physiological phenomenon known as attention consists of a complex information processing required in the execution of simple acts of perception, language and thinking. It involves the selection of relevant stimulus: the behavior becomes controlled by a reduced quantity of stimulus, which is correlated to important functional consequences [1, 2]. The effect of environmental manipulations on attention has been experimentally studied by using the animal model of latent inhibition (LI). The basic foundation of LI is the fact that the repeated pre-exposition of the subject to a neutral stimulus without consequence impairs a subsequent conditioning, in which that neutral stimulus will have the function of a conditioned stimulus [1-4]. In the LI Model the subject learns that the neutral stimulus does not signal any event of importance or motivational relevance, for not being correlated to any reinforcement and due to this characteristic the subject does not pay attention to the stimulus, occurring what has been called irrelevance learning [5].

Neural mechanisms involved in attention can be studied by using pharmacological drugs that act specifically at certain brain neurotransmitter systems and are capable of influencing attention, as evidenced by the LI model. One interesting drug to be employed in the LI model is 1,3,7-trimethylxanthine, or caffeine [6]. Caffeine is a substance extracted in great scale from the plant *Coffea Arabica*, among others. In the modern society, caffeine is largely consumed by the population in general, independently from age- and economic group. It is consumed as coffee, teas, guarana-based drinks, cocoa and/or chocolate. It is also used in the preparation of some medicaments [7]. Caffeine has psychostimulant properties by acting mostly in the higher neural centers influencing mental and emotional processes. It seems that caffeine has antagonistic action on A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors, as well as on D<sub>2</sub> receptors for dopamine [6]. These effects of caffeine are qualitatively diverse: besides influencing attention, caffeine can stimulate motor- and mental activities, and can also produce alterations in some behavioral parameters like humor, fatigue, wakefulness, association of ideas, perception and motivation [6-8].

Experimental animal studies indicate that the behavioral action of caffeine is dose-dependent; the stimulant properties of caffeine are evident in doses ranging from 10 to 40 mg/kg [6-7]. The Caffeine behavioral stimulant effects have been observed as enhancement of the spontaneous locomotor activity in the open field model [9, 10], changes in stimulus discrimination in models of conditioned discrimination and/or decrease of the perception for

aversive stimulus, such as electric shock, in the conditioned avoidance model [7]. It has been also demonstrated that caffeine has a reinforcing action in the model of place conditioned preference [11]. In human beings, doses of caffeine above 40 mg/kg seem to produce insomnia, irritability, migraine, vertigos and humming [6]. Although CAF had not produced LI effect at the dose of 10 mg/kg [12] its action still needs to be better investigated, concerning LI effects, and this is one of the goals of the present study.

The consumption of inadequate diets can lead to malnutrition and also to behavioral alterations [13, 14]. Processes underlying humor, temperament, perception and motivation can also be influenced by the dietary imbalance of some nutrients, like protein. During the brain development, the dietary protein content, as well as its quality, can influence the formation of cellular structures and the synthesis of physiologically important brain molecules like hormones and neurotransmitters. In addition, the manipulation of sensory-motor activity combined with inadequate food intake can cause permanent alterations in some structures and cerebral functions during the development [14, 15].

The Regional Basic Diet (RBD) of low-income human populations of Northeast Brazil is characterized by being multideficient and, as such, to produce malnutrition. It contains 8% of protein, of which the greatest proportion is from vegetable source. Previous studies reveal that RBD can provoke severe and sometimes permanent structural, biochemical and electrophysiological alterations in the Nervous System [16-20]. Due to these characteristics, RBD can be considered as a model of calorie-protein malnutrition.

Besides behavior, both caffeine and nutritional deficiency are postulated to influence electrophysiological properties in the brain [21, 22]. In view of that, we decided to investigate the effect of both factors on the electrophysiological phenomenon known as “cortical spreading depression” (CSD; [23, 24]), besides studying the caffeine effects on LI. CSD has been electrophysiologically characterized in laboratory animals as a reversible and slowly propagating “wave” of reduction of spontaneous and evoked cortical electrical activity, with a simultaneous DC slow potential change of the tissue [23, 25]. Recent evidence has also documented the appearance of CSD in the brain of neurological patients [26, 27]. Epileptiform-like waves appearing during CSD (while the spontaneous activity is reduced) suggests a possible involvement of CSD in brain excitability changes [23]. Experimental investigation of this relationship has involved environmental, pharmacological, genetic and nutritional paradigms [28-31]. As a rule, measuring CSD velocity of propagation along the cortical tissue is a reasonable and easy way of estimating the brain CSD susceptibility. The previous results from such experiments generally indicate that CSD propagation in the

cortical tissue of laboratory animals can be modified by clinically relevant conditions known to influence brain excitability [21].

In view of the above, the aim of the present study is to evaluate in the rat the effects of caffeine and/or early RBD-malnutrition on the behavioral paradigm known as LI, and in the electrophysiological paradigm of CSD. It is hypothesized that both treatments can alter LI- and CSD features, both individually and in combination. An abstract with some of the results has been presented [32].

## Methods

### *Animals and diets*

Experiments were carried out in accordance with the “Principles of laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA) and were approved by the Ethics Committee for Animal research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, where the experiments have been carried out. Naïve male Wistar rats from the colony of our University were used in two experiments.

### ***Experiment 1: caffeine and latent inhibition***

In Experiment 1, a group of 75-85 days-old well-nourished rats (W group; n=36 receiving a rodent lab chow diet, with 22% protein, prepared by Purina Brazil Ltd) and two groups of early-in-life RBD-malnourished animals (n=36 each group) were compared in the LI procedure. In the first malnourished group, their dams were fed during the lactation period with the “regional basic diet” (RBD), which is deficient in the quantity of protein (8%) and in their quality (proteins mostly from vegetable origin; [16]). RBD was prepared based on data from food consumption surveys in 5,939 low-income persons (from 918 families) in the south-coast of the Pernambuco state [16]. The four foods most commonly consumed by those families as the basis of their main daily meal constituted the RBD: beans (*Phaseolus vulgaris*), cassava flour (*Manioc esculenta*), sweet-potato (*Ipomaea batatas*) and jerk beef (bovine salty and dried meat). This diet, used to feed the first group of malnourished rats, will be here called RBD<sub>8</sub> to distinguish from the supplemented RBD (with 22% protein; called RBD<sub>22</sub>), used to feed a second group of malnourished rats, as described below.

In the second group of 75-85-days old malnourished rats (n=36) the dams, during the lactation period, were fed the quantitatively but not qualitatively protein-supplemented RBD [33]. This supplemented RBD, called “RBD<sub>22</sub>”, contained 22% protein from the same

qualitatively deficient vegetable sources of the non-supplemented RBD (RBD<sub>8</sub>). The composition of the two RBD diets is shown in Table 1.

The diets were administered to the lactating dams from the pups' postnatal day 2 to 25, when they were weaned. After weaning, all pup-groups received the lab chow diet. The weaned pups were then housed in 51 cm x 35.5 cm x 18.5 cm polypropylene cages, in a room with a light-dark cycle (12h/12h; lights on at 6 a.m.) and temperature of 23 ±1°C. Animals were weighed on postnatal days 10, 22, 35, 55 and 75. At 75-85 days of life, approximately twenty-three hours prior to the onset of the LI-experiment (which lasted 5 days), animals were put on a liquid-restriction schedule and subsequently only allowed access to liquids (water or sucrose, depending on the group; see Table 2) during the one-hour period of the LI-experiment, as defined by the experimental protocol. The daily volume of liquids ingested during the experimental sessions was recorded.

#### *Apparatus to test LI*

LI-Experiments were run in four acrylic chambers (23.5 X 35.5 X 40 cm) containing two holes in one lateral wall, through which the animals had access to two stainless steel nozzles. These nozzles were connected to glass bottles with a milliliter scale containing sucrose solution or water, constituting the PE- and NPE groups, as defined below.

#### *Drugs*

Caffeine –and Lithium chloride (LiCl) were dissolved in distilled water. Saline solution (NaCl 9g/L) was prepared and used as control for caffeine treatment. Animals in the drug- and control groups of experiment 1 were administered respectively caffeine (30mg/kg) and saline 20 min prior to the pre-exposure (Day 1, 2 and 3) and to the conditioning (Day 4) phases. LiCl was administered to all animals on the conditioning day (day 4). All solutions were injected by intraperitoneal route in the volume of 1 ml/kg.

#### *Latent Inhibition Procedure*

LI was assessed using a conditioned taste aversion paradigm, as previously described [34]. This paradigm measures the effectiveness of sucrose pre-exposure in preventing subsequent acquisition of a conditioned taste aversion to sucrose. This LI procedure consisted of three phases, conducted at 5 successive days, at the same time of the day in the morning period, as follows: phase 1 (pre-exposure to sucrose; day 1-3); in this phase, animals were individually placed in the experimental chamber and given access to either 50 ml of a 5% sucrose solution

(sucrose preexposed group; PE) or 50 ml of tap water (non-preexposed group; NPE) for 30 min. Phase 2: (conditioning; day 4); on day 4, all animals were given access to 50 ml of a 5% sucrose solution for 30 min immediately followed by an intraperitoneal injection of lithium chloride (LiCl; 50mg/kg in 1 ml/kg distilled water) as aversive stimulus to produce the conditioned taste aversion. Phase 3: (testing; day 5); On day 5, each animal was again placed in the experimental chamber and given simultaneous access to both 5% sucrose and water for 30 min. In PE and NPE animals latent inhibition, expressed as sucrose suppression ratio (SSR), was assessed by comparing the amount of sucrose versus water consumed on day 5, according to the following formula:

$$\text{SSR} = [\text{ml sucrose consumed}/(\text{ml sucrose consumed} + \text{ml water consumed})].$$

Both caffeine- and saline-groups were subdivided into PE and NPE groups. Both caffeine and saline were administered to the respective groups 20 min prior to the pre-exposure and conditioning phases.

### ***Experiment 2: caffeine and cortical spreading depression***

In adult rats (90 to 110 days old), which had not been previously subjected to caffeine treatment, neither used in the LI experiments, CSD was recorded on the cortical surface for a 4-hour period. Under anesthesia (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, ip), three trephine holes (2–3 mm in diameter) were drilled on the right side of the skull (two at the parietal bone and one at the frontal bone). The three holes were aligned in the fronto-occipital direction and were also parallel to the midline. CSD was elicited at 20 min intervals by applying a cotton ball (1–2 mm diameter), soaked in 2% KCl solution (approximately 0.27 M) to the anterior hole drilled at the frontal region for 1 min. The propagating CSD was monitored

simultaneously at two parietal points on the cortical surface by recording the electrocorticogram (ECoG) depression and the slow DC potential change typical of CSD. Recordings were performed by using a pair of Ag-AgCl agar-Ringer electrodes. These electrodes consisted of plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter), filled with Ringer solution solidified with the addition of 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. The pipettes were fixed together pair-wise with cyanoacrylate glue, so that the interelectrode distance was kept constant for each pair (range: 4–5.5 mm). Each pair of electrodes was connected to a lever that could be vertically moved by turning around a screw, so that the recording electrodes could be gently placed on the intact dura-mater, under low-power microscope control, without any excessive pressure on the cortical surface. A common reference electrode, of the same type, was placed on the nasal bones.

**TABLE I Percentage composition of the Regional Basic Diet, with 8% and 22% protein (respectively RBD<sub>8</sub> and RBD<sub>22</sub>).**

Ingredients	RBD <sub>8</sub> *							RBD <sub>22</sub> **						
	g/100 g	Protein	Carbohydrate	Fat	Ash	Fiber	Kcal	g/100 g	Protein	Carbohydrate	Fat	Ash	Fiber	Kcal
<b>Beans***</b>	18.9	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	<b>60.76</b>	60.0	13.5	34.87	0.78	0.57	3.57	<b>198.7</b>
<b>Manioc flour</b>	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	<b>198.80</b>	23.16	0.30	17.36	0.04	0.43	2.01	<b>71.00</b>
<b>Defatted, dried, salted meat ***</b>	3.74	2.74	-	0.06	0.06	-	<b>11.50</b>	12.30	9.01	-	0.20	0.06	-	<b>37.84</b>
<b>Fat (from the meat)</b>	0.35	-	-	0.35	-	-	<b>3.15</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Sweet Potato***</b>	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	<b>41.43</b>	4.56	0.11	3.55	0.01	0.20	0.17	<b>14.73</b>
<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>	<b>100.0</b>	<b>22.4</b>	<b>55.78</b>	<b>1.03</b>	<b>1.26</b>	<b>5.75</b>	<b>322.27</b>

\* according to Teodosio et al [16]

\*\* modified from Andrade et al [33]

\*\*\* Cooked, dried, and ground

**TABLE 2.** Distribution of the 12 experimental groups of this study according to the nutritional condition (W, well-nourished; BRD<sub>8</sub>, malnourished by feeding the basic regional diet of human populations of Northeast Brazil, with 8% protein, and BRD<sub>22</sub>, malnourished by feeding the BRD supplemented in quantity, but not in the quality of their proteins), to the drug treatment (Caf and S, respectively treatment with caffeine and saline) and to the pre-exposure to sucrose solution in the initial phase of the latent inhibition paradigm (PE, pre-exposed and NPE, non-pre-exposed). The number of rats studied are indicated in parentheses.

Group	Diet	Drug	Sucrose pre-exposure
1	Lab chow diet, with 22% protein (36)	Caf (18)	Yes (9)
2			No (9)
3		S (18)	Yes (9)
4			No (9)
5	BRD <sub>8</sub> (36)	Caf (18)	Yes (9)
6			No (9)
7		S (18)	Yes (9)
8			No (9)
9	BRD <sub>22</sub> (36)	Caf (18)	Yes (9)
10			No (9)
11		S (18)	Yes (9)
12			No (9)

After the initial 2h of recording (baseline record), caffeine (30 mg/kg) was intraperitoneally injected and the CSD recording continued for two more hours. The velocity of CSD propagation was calculated based on the time required for a CSD wave to cross the distance between the 2 recording electrodes. In the measurement of CSD velocities, the initial point of each DC negative rising phase was used as the reference point. The mean CSD velocities of propagation obtained in the pre- and post-caffeine periods were compared, in order to detect a possible effect of caffeine on CSD propagation.

During the recording session, rectal temperature was maintained at  $37\pm1$  °C by means of a heating blanket. After the recording session the animal, while anesthetized, was submitted to euthanasia by bulbar injury. This was carried out by introducing a sharp needle into the *cisterna magna*, provoking immediate cardio-respiratory arrest.

#### *Statistical analysis*

The average body weights in the three nutritional groups were compared using ANOVA followed by the Holm Sidak test.

The effects of caffeine and /or diet on LI were assessed by comparing the difference between PE and NPE groups. SSRs were analyzed by a 3X2X2 ANOVA considering as main factors nutritional status (well-nourished, RBD<sub>8</sub>- or RBD<sub>22</sub>-malnourished), sucrose pre-exposure condition (pre-exposed or non-pre-exposed) and drug treatment (caffeine or saline), followed by a post-hoc test (Holm Sidak) where indicated. CSD propagation velocities before and after caffeine were compared, in the same animal, by using the paired t-test. Differences were considered significant when  $p\leq0.05$ .

## Results

### *Experiment 1 – Caffeine and latent inhibition*

Figure 1 presents the evolution of body weight of the animals in the three nutritional conditions (W, RBD<sub>8</sub> and RBD<sub>22</sub>) from day 10 to 75 of life. ANOVA showed a significant main effect of nutritional status on the body weight ( $F[2, 490] = 1078.69; P<0.001$ ). The Holm-Sidak test revealed that the two RBD-groups presented weights significantly lower than the W-group from day 10 to 35. On days 55 and 75, the RBD<sub>8</sub> group still displayed lower body weights than the other two groups, which did not differ from each other.

Figure 2 presents the mean fluid intake of the three nutritional groups during the first phase of the LI procedure (days 1, 2 and 3). On day 1, ANOVA revealed an effect of the drug-sucrose pre-exposure interaction ( $F[1, 106]=5.920; P<0.017$ ). The Holm-Sidak test indicated that caffeine-treated rats drank less fluid than the corresponding saline animals, in the RBD<sub>8</sub> group. On day 2, there was a significant effect of the main factors sucrose pre-exposure ( $F[1, 106]=6.285; P<0.014$ ) and drug ( $F[1, 106]=4.745; P<0.032$ ), and also the following factor interactions: diet x drug ( $F[3, 103]=11.446; P<0.001$ ) and sucrose pre-exposure x drug ( $F[2, 104]=6.704; P<0.011$ ). The Holm-Sidak test indicated that caffeine-treated rats drank less fluid than the corresponding saline animals in the W- and the RBD<sub>8</sub> groups. However, in the

RBD<sub>22</sub> animals caffeine increased the intake of fluid. On day 3, there was a significant effect of the main factors diet ( $F[2, 105]=7.788; P<0.001$ ) and sucrose pre-exposure ( $F[1, 106]=41.693; P<0.001$ ). The Holm-Sidak test indicated that in the RBD<sub>22</sub> group sucrose-pre-exposed rats drank a higher amount of fluid than the non-pre-exposed ones, as compared to the respective RBD<sub>8</sub>- and W-animals.

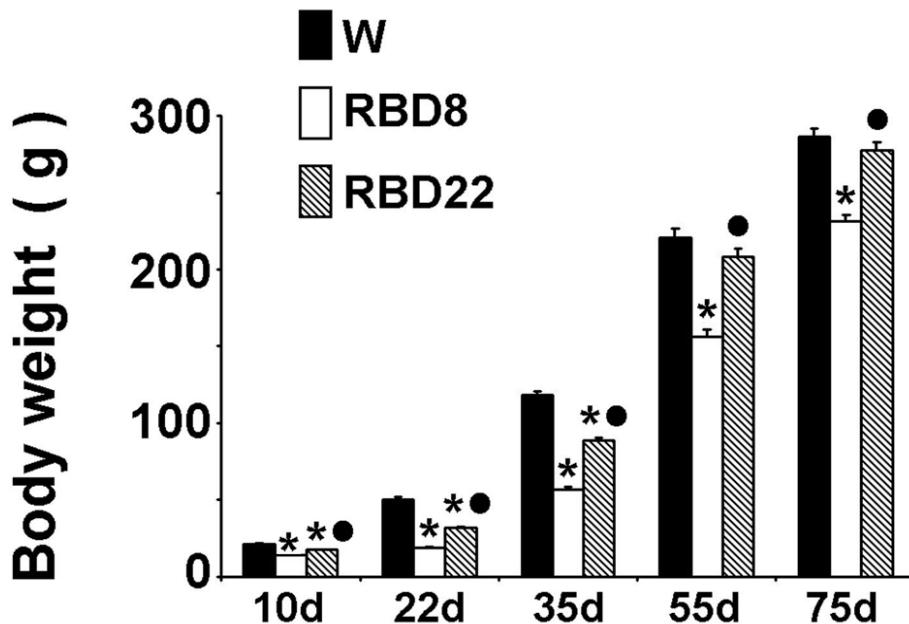


Figure 1- Body weight (mean±standard error of the mean) of well-nourished (W) and early-malnourished rats with 10 to 75 days of age. Malnutrition was produced by feeding the lactating dams with the “regional basic diet” containing 8% protein (RBD<sub>8</sub>) or a BRD supplemented to contain 22% protein of the same origin mostly from vegetables (RBD<sub>22</sub>). Data are expressed as mean±standard error of the mean. The asterisks indicate malnourished values that are significantly different from the corresponding well-nourished controls. The black circles denote RBD<sub>22</sub> values significantly different from the respective RBD<sub>8</sub> measurements ( $P<0.05$ , ANOVA followed by the Holm-Sidak test).

Figure 3 shows the sucrose suppression ratio (see methods), indicative of the LI phenomenon. As expected, ANOVA confirmed the significant effect of the main factor sucrose pre-exposure ( $F[1, 106]=47.074; P<0.001$ ). Also, a significant interaction between the factors sucrose pre-exposure and drug was found ( $F[2, 104]=13.124; P<0.001$ ). The Holm-Sidak test indicated an antagonistic action of caffeine in the W- and RBD<sub>8</sub>-groups, but not in the RBD<sub>22</sub> condition.

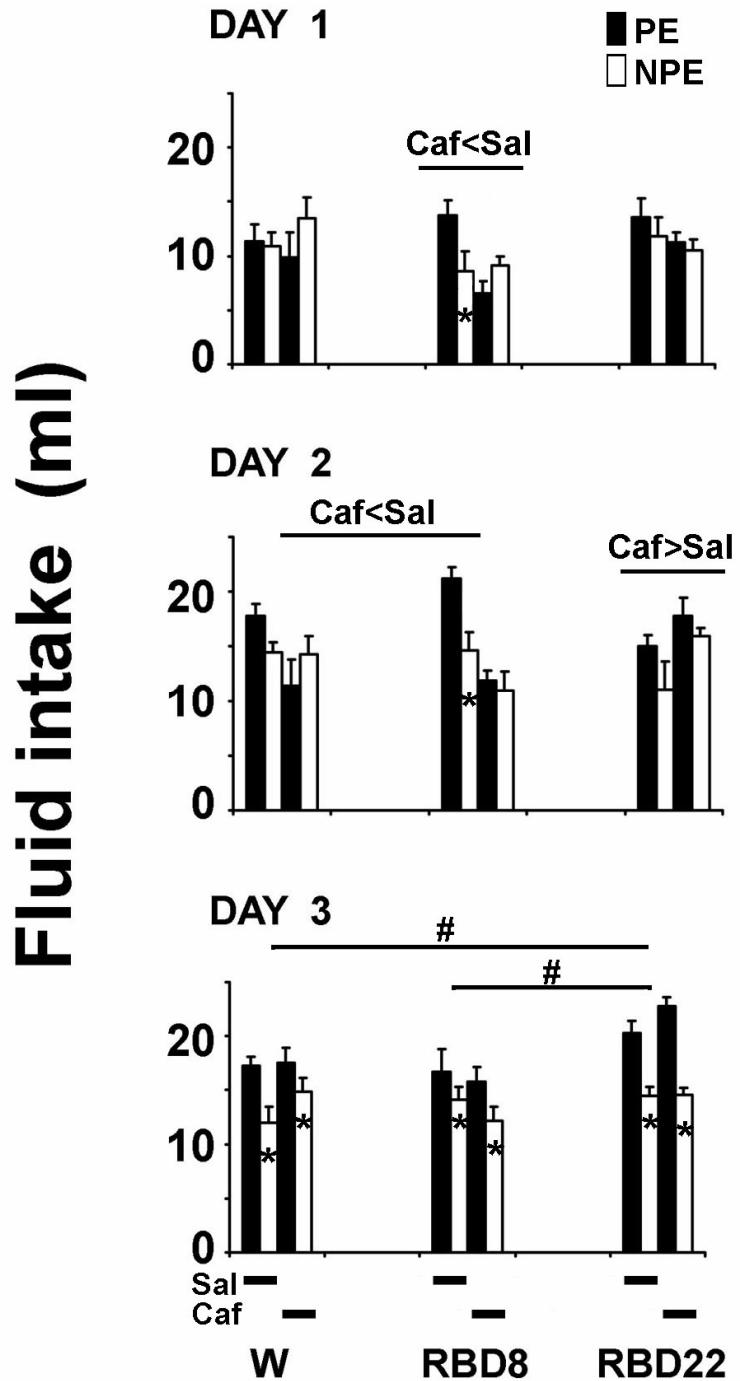


Figure 2- Effect of caffeine (Caf) on the intake of sucrose (PE-groups, preexposed to sucrose) or saline (Sal; NPE-groups, non-preexposed) in well-nourished (W) and RBD-malnourished rats (RBD<sub>8</sub> and RBD<sub>22</sub> condition) during the days 1, 2 and 3 of the LI procedure (phase 1, or pre-exposure phase). Data are ml of the corresponding solution (sucrose or saline) ingested by the PE- and NPE-groups, respectively, expressed as mean±standard error of the mean. The asterisks indicate NPE-values significantly different from the corresponding PE- intake. The # symbol on day 3 denotes different intake behavior among distinct dietary groups, concerning the factor pre-exposure to sucrose (PE>NPE; P<0.05, three-way ANOVA followed by the Holm-Sidak test).

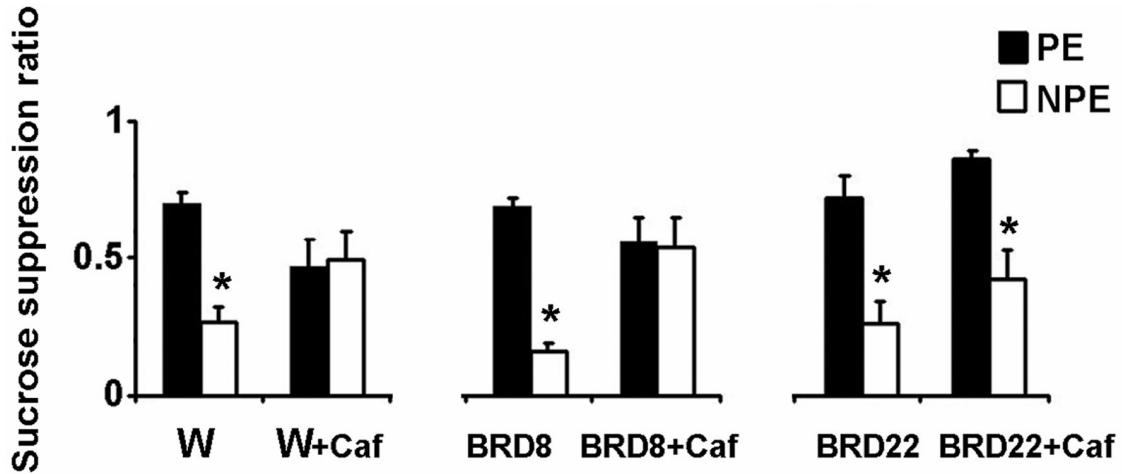


Figure 3- Effect of 30mg/kg caffeine and saline on the sucrose suppression ratio (SSR) on day 5 (test day) during the LI procedure, after having used sucrose as neutral stimulus in the pre-exposure phase (days 1 to 3). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. The asterisks indicate NPE-values significantly different from the corresponding PE-measurements ( $P<0.05$ ; ANOVA followed by the Holm-Sidak test)

#### *Experiment 2 – Caffeine and cortical spreading depression*

As a rule, the application of KCl for 1 min to a point of the frontal cortical surface effectively elicited a CSD episode, which propagated and was recorded at the two parietal recording points. In the RBD<sub>8</sub> group, in some cases the KCl stimulation elicited more than one CSD episode, suggesting a malnutrition-related higher cortical susceptibility to the CSD-phenomenon, as compared to the W-group.

Figure 4 presents the mean CSD velocity of propagation in the three nutritional groups, before and after 30 mg/kg caffeine. The post-caffeine values were not different from the pre-caffeine velocities in the same animals ( $P>0.05$ ; paired t-test), indicating lack of effect of this drug. However, ANOVA revealed a significant effect of the factor diet. The Holm-Sidak test indicated that the two malnourished groups displayed higher CSD velocities, as compared to the W controls ( $F[2, 31]=14.439$ ;  $P<0.001$ ).

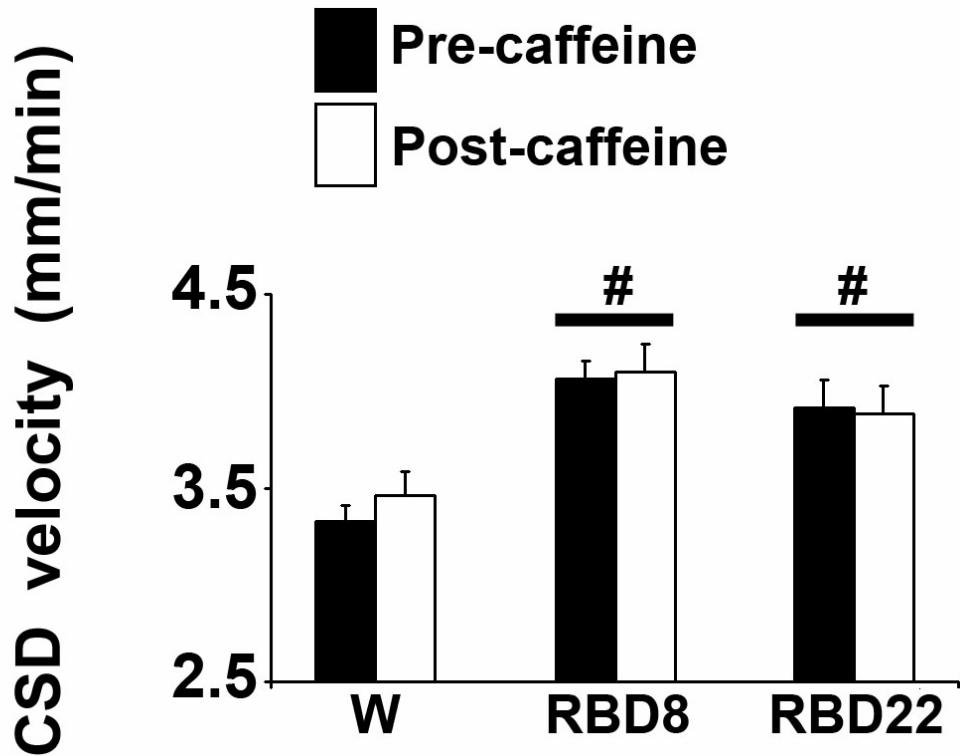


Figure 4- CSD velocities (mean $\pm$ standard error of the mean) in adult rats whose mothers were fed during the lactation period with a commercial lab chow diet with 22% protein (well-nourished –W- group), or with the “regional basic diet containing 8% protein (RBD<sub>8</sub> group) or a RBD supplemented to contain 22% protein of the same origin (mostly from vegetable source; RBD<sub>22</sub>). Post-caffeine velocities did not differ from the corresponding pre-caffeine values, obtained in the same animals. The # symbol indicate that the RBD-animals have higher CSD velocities, as compared to those of the well-nourished control group ( $P<0.05$ ; ANOVA plus Holm-Sidak test).

#### 4. Discussion

In the present work we investigated the brain actions of caffeine, as well as the interaction between caffeine and early malnutrition, by comparing the effects in an attention-dependent behavior (LI) and in an electrophysiological paradigm (CSD). Data indicate that caffeine treatment differentially antagonized the LI, but not the CSD phenomenon, and that the LI effect of caffeine is influenced by malnutrition. The underlying mechanisms of the presently documented novel caffeine effect will be discussed in light of the evidence supporting the involvement of caffeine modulation of dopaminergic receptors at the subcortical level that participate in attention processes. On the other hand, dopaminergic modulation is speculated not to participate much in the CSD propagation mechanisms at the cortical level.

#### *4.1 Caffeine, malnutrition and latent inhibition*

The reduced body weight presently found in the RBD-animals indicates that this dietary treatment effectively provoked malnutrition in the pups and this affected their body development, with probable consequences on brain structure and function. The weight differences between the two groups fed 22%-protein diets (the W- and the RBD<sub>22</sub> groups) illustrate the importance of the quality of the dietary proteins. These data confirm previous studies in which the RBD model has been used [16, 19, 28].

During the initial phase of the LI procedure the progressive daily increase in the fluid intake, as well as the differential intake of the PE and NPE groups (PE>NPE) have been previously reported in a conditioned taste aversion paradigm used to test drug effects [34-36] and is now confirmed (see Figure 2).

It appears that at least some of the brain actions of caffeine can have as underlying mechanism the interaction between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors [6, 37]. Dopaminergic transmission via D<sub>2</sub> receptors is expected to increase as a consequence of an inhibition of A<sub>2A</sub> receptors by caffeine [37]. Drugs having dopaminergic antagonism are effective in the treatment of psychotic diseases like schizophrenia, whose biological basis involves attention impairment [38]. According to these authors, as a model involving selective attention, LI has been considered an animal model of schizophrenia. Studies on humans and laboratory animals demonstrate that dopaminergic agents can harm the attention, as indexed by the LI model, [2, 12, 36, 38-42]. In line with this evidence, caffeine has been shown to increase the rotation behavior consequent to dopamine-receptor activation; furthermore, the caffeine effects on LI are similar to those of amphetamine [6]). The data collectively supports our speculation that modulation of dopaminergic receptors by caffeine would be involved at least in part on the LI effects. All the evidence notwithstanding, this will have to be confirmed in the future by quantifying the caffeine effect at the dopamine-receptor level.

As already pointed out (see introduction), the behavioral action of caffeine is dose-dependent, with effective doses varying between 10 and 40 mg/kg [6, 7]. A single study has so far addressed the relationship between caffeine administration and LI effects [12]. The authors reported that caffeine at a dose of 10 mg/kg increased locomotion, but had no effect on LI. In contrast, the present study unequivocally showed that 30 mg/kg caffeine antagonized LI. Both in the well-nourished and in the RBD<sub>8</sub> malnourished groups LI abolishment was associated with the caffeine treatment and not with the injection stress, since in the saline-injected groups LI did not change (see Figure 3). The absence of LI effects of caffeine reported previously by

others [12] contrasts with the present findings. In the above-mentioned study however, the caffeine dose corresponded to one-third of that of the present work (10 and 30 mg/kg, respectively) and the LI procedure employed an active avoidance chamber, instead of conditioned taste aversion as we presently used. These methodological discrepancies could explain, at least in part, the differences in caffeine effectiveness between our report and the previous one mentioned above. This point also needs to be better clarified.

The present data clearly demonstrated that the nutritional imbalance produced by RBD<sub>22-</sub> but not by RBD<sub>8</sub> treatment of the lactating dams influenced the effect of caffeine on LI in their offspring at adulthood (compare the three dietary groups in Figure 3). This differential caffeine effect in the two RBD-malnourished groups can be attributed to the distinct imbalances established in the organism, regarding the ratios between the amino acids provided by each diet. In other words, we suggest that it is an effect dependent on the quality rather than on the quantity of the dietary protein. Interestingly, caffeine-induced differential effects on fetal rat brain depending on dietary protein have been previously reported [43].

As largely documented, the biochemical and morphological organization of the brain can be disrupted by nutritional imbalance (see [14] for a review), and this usually has consequences on behavioral [44] as well as electrophysiological [19] aspects of brain function. Sensory-motor processes underlying sensation perception and the execution of motor tasks can be affected by nutritional deficiency. Malnutrition-induced brain functional impairment also includes disturbances involving consciousness, emotion, learning, memory and cognition. Observations in very low birthweight infants and children collectively indicate a causal relationship between impaired neurodevelopmental outcome and deficient behavioral processes involving reduced visual [45, 46] and verbal function [47], with negative consequences in the responses to novel and competitive situations [48]. Concerning the interaction between the caffeine effects and the nutritional status, a single morphological study in the rat is available and refer that protein-energy malnutrition combined with administration of caffeine during pregnancy permanently modifies the development of the trigeminal nuclear center [49]. The present LI behavioral data are consistent with those of that previous study [49], concerning the interaction of the two factors (caffeine and malnutrition). However, the electrophysiological results on the CSD phenomenon contrast with the LI ones, as will be discussed in the next session.

#### *4.2 Caffeine, malnutrition and cortical spreading depression*

Our data demonstrated that the caffeine antagonizing effect on LI was not seen in the CSD phenomenon, neither in the well-nourished nor in the malnourished groups. However, confirming previous results [19] a facilitating effect of RBD-malnutrition on CSD propagation has been found. This CSD facilitation has been causally associated, at least in part, to the brain changes induced by malnutrition, including: (1) disturbances in the action of synaptic neurotransmitters, (2) increase in the brain cell packing density and (3) reduction in the myelination of the brain [14, 50]. Concerning myelination, an inverse correlation between brain myelination and CSD propagation has been recently demonstrated by employing dietary, genetic (transgenic animals) and immuno-histochemical approaches [31]. These authors have also shown the dichotomous nature in the modulation of such effect, i.e., CSD was accelerated in myelin-deficient and decelerated in hypermyelinated rodents. Of note, by comparing CSD propagation in adult rats malnourished, well-nourished and over-nourished during the lactation period, a similar dichotomous CSD modulation has also been demonstrated (CSD acceleration in malnourished- and deceleration in over-nourished rats, as compared to the well-nourished controls; [51]). From the above, we postulated that the action of caffeine on the brain, by being more selective than the actions of malnutrition, has affected more the subcortical dopaminergic processes underlying the LI phenomenon in comparison to the cortical processes involved in CSD. In support to this postulation, a previous study has reported a lack of action of apomorphine on CSD in the rat brain [52]. Also, unpublished data from our laboratory documented the absence of effect of haloperidol on CSD.

In conclusion, our results document, for the first time, a novel impairing behavioral effect of caffeine on an attention-related process, as assessed by the LI model, but not electrophysiological effect on the CSD phenomenon. The caffeine effect seems to be influenced by the type of malnutrition early in life. The suggestion of a dopamine-based modulation of caffeine at the subcortical, but not at the cortical level seems to us very tempting and shall be further investigated. Our data contribute to improve the knowledge of the mechanisms of the brain caffeine effects, as well as of the drug-nutrition interactions. It might thus be useful to shed light on the underlying pharmacological mechanisms acting at the brain cortical and subcortical levels.

## Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CAPES, CNPq, MS-SCTIEDECIT (No.17/2006), Facepe and IBN-Net (No. 4191) for financial support. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 307846/2004).

## References

- [1] Alves CRR, Silva MTA. Facilitation of latent inhibition by the atypical antipsychotic risperidone. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68:503-506.
- [2] Alves CRR, DeLucia R, Silva MTA. Effects of fencamfamine on latent inhibition. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 2002; 26:1089-1093.
- [4] Lubow RE. (1973). Latent inhibition. *Psychol Bull* 1973; 79:398-407.
- [3] Weiner I, Shadach E, Barkai R, Feldon J. Haloperidol- and clozapine-induced enhancement of latent inhibition with extended conditioning: implications for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Neuropsychopharmacol* 1997; 16:42-50.
- [5] Mackintosh MJ. The psychology of animal learning. New York: Academic Press, 1974.
- [6] Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999; 51:83-133.
- [7] McKim WA. Drugs and behavior: An introduction to behavioral pharmacology. 3th ed. New Jersey: Prentice Hall 1996; p191-210.
- [8] Delucia R, Martin MT, Cruz FC, Planeta CS. Estimlantes de Ação Central. In: Delucia R, Oliveira-Filho RM, Planeta CS, Galicci M, Avellar MC. Eds. Farmacologia Integrada. 3th ed. Rio de Janeiro: Revinter 2007; p260-266.
- [9] Concannon JT, Schechter MD. Failure of amphetamine isomers to decrease hyperactivity in developing rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1982; 17:5-9.
- [10] Nikodijević OKA, Daly JW. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 44:199-216.
- [11] Brockwell NT, Eikelboom R, Beninger RJ. Caffeine-induced place and taste conditioning: production of dose-dependent preference and aversion. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 38:513-517.
- [12] Bakshi VP, Geyer MA, Taaid N, Swerdlow NR. A comparison of the effects of amphetamine, strychnine and caffeine on prepulse inhibition and latent inhibition. *Behav Pharmacol* 1995; 6:801-809.

- [13] Françolin A, Brandão ML, Almeida, SS. Early postnatal protein malnutrition causes resistance to the anxiolitic effects of diazepam as assessed by the fear-potentiated startle test. *Nutr Neurosci* 2007; 10:23-29.
- [14] Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:91-128.
- [15] Dobbing J. Vulnerable periods in developing brain. In: Davison A. N, Dobbing J. eds. *Applied Neurochemistry*. Oxford: Blackwell, 1968; p287-316.
- [16] Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1990; 40:533-547.
- [17] Picanço-Diniz CW, Araújo MS, Borba JMC., Guedes, RCA. NADPH- Diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr Neurosci* 1998; 1:35-48.
- [18] Guedes RCA., Andrade AFD, Cabral-Filho JE. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20:639-642.
- [19] Rocha-de-Melo AP, Guedes RCA. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30:663-669.
- [20] Silva AT, Costa FBR, Costa JA, Teodósio NR, Cabral-Filho JE, Guedes RCA. Sciatic nerve conduction velocity of malnourished rats fed the human "basic regional diet" of the northeast of Brazil. *Braz J. Med Biol Res* 1987; 20:383-392 .
- [21] Guedes RCA. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience. In: Liebermann H., Kanarek R. and Prasad C. eds. *Nutritional Neurosciences: overview of an emerging field*, New York: CRC Press, Nutrition, Brain and Behavior Series, 2005; p 39-54, vol.3.
- [22] Tchekalarova J, Kubová H, Mares P. Effects of early postnatal caffeine exposure on seizure susceptibility of rats are age- and model dependent. *Epil Res* 2010; *in press*.
- [23] Leão AA P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7:359–390.

- [24] Gorgi A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev* 2001; 38:33–60.
- [25] Leão AAP. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1947; 10:409–414.
- [26] Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R; Co-Operative Study of Brain Injury Depolarisations (COSBID). Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 2008; 63:720–728.
- [27] Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol* 2008; 119:1973–1984.
- [28] Amâncio-dos-Santos A, Pinheiro PCF, Lima DSC, Ozias MG, Oliveira MB, Guimarães NX, Guedes RCA. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Exp Neurol* 2006; 200:275-282.
- [29] Costa-Cruz RRG, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RCA. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett* 2006; 401:271-275.
- [30] Fregni F, Liebetanz D, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Amâncio-dos-Santos A, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Guedes RCA. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Exp Neurol* 2007; 204:462-466.
- [31] Merkler D, Klinker F, Jürgens T, Glaser R, Paulus W, Brinkmann BG, Sereda M, Guedes RCA, Brück W; Liebetanz D. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann Neurol* 2009; 66:355-365.
- [32] Aguiar MJL, Guedes RCA, Silva MTA, Alves CRR. Effect of caffeine on a model of attention in rats. In: II Symposium of the international institute of neurosciences of Natal (IINN), 2007, Natal. Abstracts; p.228.

- [33] Andrade A, Guedes RCA, Teodósio N. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23:889-893.
- [34] Turgeon SM, Auerbach EA, Duncan-Smith MK, George JR, Graves WW. The delayed effects of GTG and MK-801 on latent inhibition in conditioned taste-aversion paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 533-539.
- [35] Ellenbroek BA, Knobbut DA, Cools AR. The role of mesolimbic and nigrostriatal dopamine in latent inhibition as measured with the conditioned taste aversion paradigm. *Psychopharmacology* 1997; 129:112-120.
- [36] Russig H, Kovacevic A, Murphy CA., Feldon, J. Haloperidol and clozapine antagonise amphetamine-induced disruption of latent inhibition of conditioned taste aversion. *Psychopharmacology* 2003; 170:263-270.
- [37] Ferré S, Fuxe K, Von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* 1992; 51:501–512.
- [38] Moser PC, Hitchcock JM, Liste S, Moran PM. The pharmacology of latent inhibition as an animal model of schizophrenia. *Brain Res Rev* 2000; 33:275-307.
- [39] Gray NS, Pickering AD, Hemsley DR, Dawling S, Gray JA. Abolition of latent inhibition by a single 5 mg dose of d-amphetamine in man. *Psychopharmacology* 1992; 107:425-430.
- [40] Killcross AS, Dickinson A, Robbins TW. Amphetamine-induced disruptions of latent inhibition are reinforcer mediated: implications for animal models of schizophrenic attentional dysfunction. *Psychopharmacology* 1994; 185-195.
- [41] Thornton JC, Dawe S, Lee C, Capstick C, Corr PJ, Cotter P, Frangou S, Gray NS, Russell MAH, Gray JA. Effects of nicotine and amphetamine on latent inhibition in human subjects. *Psychopharmacology* 1996; 127:164-173.
- [42] Weiner I, Lubow RE.; Feldon J. Disruption of latent inhibition by acute administration of low doses of amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 30:871-878.
- [43] Yazdani M, Tran TaiH, Conley PM, Laurent J, Nakamoto T. Effect of protein malnutrition and maternal caffeine intake on the growth of fetal rat brain. *Biol Neonate* 1987; 52:86-92.

- [44] Fukuda MTH, Françolin-Silva AL, Hernandes AS, Valadares CT, Almeida SS. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in Morris water maze. *Nutr Neurosci* 2007; 10:251-259.
- [45] Dowdeswell HJ, Slater AM, Broomhall J, Tripp J. Visual deficits in children born at less than 32 weeks gestation with and without major ocular pathology and cerebral damage. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:1-6.
- [46] Powls A, Botting N, Cooke RWI, Stephenson G, Marlow N. Visual impairment in very low birth-weight children. *Arch Dis Child* 1997; 76:82-87.
- [47] Meeks-Gardner JM, Grantham-McGregor SM. Physical activity, undernutrition and child development. *Proc Nutr Soc* 1994; 53:241-248.
- [48] Barret DE, Radke-Yarrow M. Effects of nutritional supplementation on children's responses to novel, frustrating and competitive situations. *Am J Clin Nutr* 1985; 42:102-120.
- [49] Saito TCH, Narayanan F, Joseph Jr, Yoshino S, Nakamoto T. Combined effects of caffeine and malnutrition on the development of the trigeminal nuclear center: autoradiographic and biochemical studies. *Physiol Behav* 1995; 58:769-774.
- [50] De Luca B, Cioffi LA, Bures J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activ Nerv Sup* 1977; 19:130-131.
- [51] Rocha-de-Melo AP, Cavalcanti JB, Barros AS, Guedes RCA. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr Neurosci* 2006; 9:155-160.
- [52] Amorim LF, Guedes RCA, Medeiros MC, Silva AT, Cabral-Filho JE. Apomorphine does not mimic the effects of REM-sleep deprivation on cortical spreading depression. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21: 611-614.

## **9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Como dito inicialmente, nesta tese investigou-se os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos da cafeína; adicionalmente, testou-se a possibilidade de esse efeito ser modificado pela desnutrição durante o desenvolvimento. Como na LI os animais têm que ser tratados com cloreto de lítio, investigou-se também os efeitos desse composto sobre o fenômeno eletrofisiológico da DAC.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) A cafeína dificultou a atenção, tanto nos animais nutridos (grupo Labina) quanto nos precocemente desnutridos (grupo DBR<sub>8</sub>), a julgar pelo observado nos experimentos da LI;
- 2) A suplementação quantitativa da DBR (grupo DBR<sub>22</sub>) aboliu esse efeito, sugerindo que ele é modulado pelo estado nutricional;
- 3) A propagação da DAC não foi modificada pela cafeína. A facilitação da DAC associada à desnutrição pela DBR<sub>8</sub> e DBR<sub>22</sub> confirmou estudos anteriores deste laboratório;
- 4) À semelhança da cafeína, o tratamento com Cloreto de Lítio não teve efeito sobre a propagação da DAC nos animais nutridos, mas, ao contrário da cafeína, dificultou a DAC na desnutrição pela DBR<sub>8</sub>. A suplementação quantitativa de proteínas (DBR<sub>22</sub>) reverteu esse efeito do lítio, indicando que tal efeito é dependente do estado nutricional.
- 5) A comparação dos dados da LI com os da DAC indica ausência de correlação entre os efeitos comportamentais e as eletrofisiológicas da cafeína, o que pode ser devido a uma maior ação dessa substância nas estruturas cerebrais envolvidas na LI (estruturas predominantemente sub-corticais), do que no tecido cortical, onde se estudou a DAC.

## **10. PERSPECTIVAS**

O presente trabalho permite vislumbrar as seguintes perspectivas:

- 1º) Investigar se a aplicação tópica cortical da cafeína, em diferentes concentrações, produz efeitos sobre a DAC;
- 2º) Analisar os efeitos da aplicação crônica da cafeína durante o período crítico do desenvolvimento cerebral, sobre a LI e a DAC;
- 3º) Estudar possíveis efeitos neurais do cloreto de Lítio em distintos períodos após sua aplicação.
- 4º) Verificar se manipulações nutricionais, diferentes das deste trabalho, também podem interferir nos efeitos neurais da cafeína.

## 11. REFERÊNCIAS

AMARAL, A. P. B. *et al.* Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. *Exp Neurol*, v. 219, p. 492-498, 2009.

ALMEIDA, S. S. *et. al.* Nutrition and Brain Function: a Multidisciplinary Virtual Symposium. Nutritional Neuroscience, v. 5 (5), p. 311-320, 2002.

ALVES, C. R. R.; AGUIAR, M. J. L.; GUEDES, R. C. A. A importância da nutrição para o comportamento e aprendizagem. A importância da nutrição para o comportamento e aprendizagem. São Paulo: Revista Encontro: Revista de Psicologia, v. 9, n. 11, p. 86-96, 2005.

ALVES, C. R. R.; SILVA, M. T. A. Modelos animais em psicologia: esquizofrenia. In: GUILLARDI, H. J.; MADI, M. B. B. P.; QUEIROZ, P. P.; SCOZ, M. C. (Eds.). Sobre comportamento e cognição: contribuições para a construção da teoria do comportamento. Santo André – SP: ESETec Editores Associados, v. 10, p. 40-60, 2002.

ALVES, C. R. R.; SILVA, M. T. A. Facilitation of latent inhibition by the atypical antipsychotic risperidone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 68, 2001.

ALVES, C. R. R.; GUERRA, L. G. G. C.; SILVA, M. T. A. Inibição latente: um modelo experimental de esquizofrenia. *Psiquiatria Biológica*, 1999.

ANDRADE, A.; GUEDES, R. C. A.; TEODÓSIO, N. Enhanced Rate Of Cortical Spreading Depression Due To Malnutrition: Prevention By Dietary Protein Supplementation. Ribeirão Preto: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 23, p. 889-893, 1990.

BATISTA-FILHO, M. **Pesquisa nutricional na zona da mata.** *Universidade Federal de Pernambuco, Recife*, 133, 1968.

BATISTA-FILHO, M. **Inquérito nutricional em área urbana da Zona da Mata do Nordeste Brasileiro - Água Preta, Pernambuco.** *O Hospital*, 79, p. 139 – 155, 1971.

BEDI, S. **Nutritional effects on neuron numbers.** *Nutritional Neuroscience*, 6 (3), p. 141-152, 2003.

BRANDÃO, M. L.; MORATO, S. Comportamento alimentar. In: BRANDÃO, M. L. (Org.). **Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento.** São Paulo: Atheneu, 2002.

BROCKWELL, N. T.; EIJKELBOOM, R.; BENINGER, R. J. **Caffeine-induced place and taste conditioning: Production of dose-dependent preference and aversion.** *Pharmacology, biochemistry and behavior*, v. 38, n.3, p. 513-517, 1991.

CHAVES, N. *et. al.* **Influence of nutrition on hormone secretion. I. Study in Água Preta.** *Rev Bras Pesqui. Med Biol.*, p. 261-70. 1975.

DALY J. W. **Mechanism of action of caffeine, in Caffeine, Coffee, and Health.** Garattini S ed., p 97–150, Raven Press, New York. 1993.

DALY, J. W.; BRUNS, R. F.; SNYDER, S. H. **Adenosine receptors in the central nervous system: Relationship to the central actions of methylxanthines.** *Life Sci.*, v. 28, p. 2083-2097, 1981.

DAWSON, E. B. The relationship of tap water and physiological levels of lithium to mental hospital admission and homicide in Texas. In: Schrauzer GN, Klippe KF, eds: "**Lithium in Biology and Medicine.**" Weinheim: VCH Verlag, p. 171–187, 1991.

DELUCIA, R.; PLANETA, C. S. Estimulantes de Ação Central. In: DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M. (Org.). **Farmacologia Integrada.** Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p. 260-266.

DE LUCA, B.; CIOFFI, A.; BURES, F. **Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats.** *Activ Nerv Sup*, v. 19, p. 130–131, 1977.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON, A. N.; DOBBING, J. (ed.). **Applied Neurochemistry**, Oxford: Blackwell, 1968. p. 287-316.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de Fisiologia aplicada a Nutrição.** São Paulo: Robe Editorial, v. 14, 2002.

ELLENBROEK, B. A.; KNOBBOUT, D. A.; COOLS, A. R. **The role of mesolimbic and nigrostriatal dopamine in latent inhibition as measured with the conditioned taste aversion paradigm.** *Psychopharmacology*, v. 129, p. 112-120, 1997.

ENSLEN, M.; MILON, H.; WURZNER, H. P. **Brain catecholamines and sleep states in offspring of caffeine-treated rats.** *Experientia (Basal)*, v. 36, p. 1105- 1106, 1980.

FERNSTROM, J. D. **Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain.** *Physiological Reviews*, v. 63 (2), p. 484-546, 1983.

FERNSTROM, J. D. **Can nutrient supplements modify brain function?** American Journal of Clinical Nutrition, v. 71(suppl.), p. 1669S-1673S, 2000.

FRAZÃO, M. F.; MAIA, L. M. S. S.; GUEDES, R. C. A. **Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression.** *Neurosci Lett*, v. 447, p. 26-30, 2008.

FREDHOLM, B.B. *et al.* **Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use.** Pharmacological Reviews, v. 51, p. 83-133, 1999.

FUKUDA, M. T. H.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. **Early posnatal protein malnutrition affects learning and memory in distal but not in the proximal cueversion of Morris water maze.** Behavioural Brain Research, v. 133, p. 271-277, 2002.

GEDDES, J. R *et al.* **Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *Am J Psychiat*, v. 161, p. 217-222, 2004.

GUEDES, R. C. A. **Electrophysiological methods: Application in Nutritional Neuroscience: Overview of an emerging field.** New York: CRC Press, p. 39-54, 2005.

GUEDES, R. C. A.; CAVALHEIRO, E. A. **Blockade of Spreading Depression in Chronic Epileptic Rats: Reversion by Diazepam.** Epilepsy Research, v. 27, p.33-40, 1997.

GUEDES, R. C. A. *et al.* **Effect of Dietary Lithium on Cortical Spreading depression.** *Braz J Med Biol Res*, v. 22, p. 923-925, 1989.

GUEDES, R. C. A.; ANDRADE, A. F. D.; CABRAL-FILHO, J. E. **Propagation Of Cortical Spreading Depression in Malnourished Rats: Facilitatory Effect Of Dietary Protein Deficiency.** Ribeirão Preto –SP: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 20, p. 639-642, 1987.

GRIFFITHS. R. R.; MUMFORD, G. K. Caffeine-a drug of abuse? In: BLOOM, F. E.; KUPFER D. J. (EDS.). **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**, New York: Raven Press LTd. 1995.

GRIFFITHS, R. R.; WOODSON, P. P. **Caffeine physical dependence: a review of human and laboratory animal studies.** Berl: Psychopharmacology, v. 94 (4), p. 437-451, 1988.

HAN, S. R. *et al.* **Differential Expression of Activating Transcription Factor-2 and c-Jun in the Immature and Adult Rat Hippocampus Following Lithium-Pilocarpine Induced Status Epilepticus.** Yonsei Med J, v.50, p. 200-205, 2009.

HEPPNER, C. C.; KEMBLE, E. D.; COX, W. N. **Effects of blood deprivation on caffeine consuption in male and female rats.** Pharmacol. Biochem. Behav., p. 1555-1559, 1986.

HOLLOWAY JUNIOR, W. R. **Caffeine: Effects of acute and chronic exposure on the behavior of neonatal rats.** Neurobehav. Toxicol. Teratol., v. 4, p. 21-32, 1982.

JOHNSON, S. A. *et al.* **Lithium treatment prevents stress-induced dendritic remodeling in the rodent amygdala.** *Neuroscience*, v. 163, p. 34-39, 2009.

LEÃO, A. A. P. *Journal of Neurophysiology*, v. 10, p. 409- 414, 1947.

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

LEHMENKÜHLER, A.; GROTEMEYER, K. H.; TEGTMEIER, F. (Eds.) **Migraine: basic mechanisms and treatment.** Munich: Urban and Schwarzenberg, 1993.

LIMA, D. S. C. *et al.* **L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats.** *Life Sci*, v. 85, p. 241-247, 2009.

LUBOW, R. E.; MOORE, A. U. **Latent inhibition: the effect of nonreinforced pre-exposure to the conditional stimulus.** *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 52, p. 415 – 419, 1959.

MACKINTOSH, M. J. **The psychology of animal learning.** New York: Academic Press, 1974.

MALNIC, G.; AFECHE, S. C.; CIPOLLA-NETO, J. Meio interno e homeostase. In: AIRES, M. D. M. (Org.). **Fisiologia**, 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 1999.

MORATO, M, S. As bases biológicas do comportamento: introdução a neurociências. In: M. L. BRANDÃO (Org.). **Comportamento alimentar.** São Paulo: E.P.U., 2004.

MORGANE, P. J. *et. al.* **Prenatal malnutrition and development of the brain.** *Neurosci. Biobehav. Rev*, v. 17, p. 91- 128, 1993.

MORGANE, P. J. *et. al.* **The Effects of Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System of the Rat.** *Neuroscience Biobehavior Rev*, v. 2, p.137-230, 1978.

MOSER, P. C. *et. al.* **The pharmacology of latent inhibition as an animal model of schizophrenia.** *Brain Research Reviews*, v. 33, p. 275-307, 2000.

MCKIM, W. A. **Drugs and Behavior**. Prentice Hall, 3ºedition, 1996.

NIKODIJEVIĆ, O. K. A.; DALY, J. W. **Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal**. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 44, p. 199-216, 1993.

OMS/FAO 32. **Relatório pericial sobre dieta alimentar, nutrição e prevenção de doenças crônicas**. Organização Mundial da Saúde, 2003. Disponível em: <[http://who.int/nutrition/publications/pressrelease32\\_pt.pdf](http://who.int/nutrition/publications/pressrelease32_pt.pdf)>. Acesso: 05 de fevereiro de 2007.

O'BRIEN, W. T. *et al.* **Glycogen Synthase Kinase-3-Beta Haploinsufficiency Mimics the Behavioral and Molecular Effects of Lithium**. *J Neurosci*, v. 24, p. 6791–6798, 2004.

PICANÇO-DINIZ, C. W. *et. al.* **NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development**. Nutritional Neuroscience, v. 1 (1), p. 35- 48, 1998.

ROCHA-DE-MELO, A. P. *et al.* **Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood**. *Nutr Neurosci*, v. 9, p. 155–160, 2006.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES, R. C. A. **Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, São Paulo, v. 30, p. 663-669, 1997.

SIEPMANN, M.; KIRCH, W. **Effects of Caffeine on Tomographic Quantitative EEG.** Neuropsychobiology, v. 45 (3), p. 161-166, 2002.

SILVA, A. T. *et. al.* **Sciatic Nerve Conduction Velocity Of Malnourished Rats Fed The Humanbasic Regional Diet Of The Northeast Of Brazil.** Ribeirão Preto – SP: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 20, p. 383-392, 1987.

SINTON, C. M.; VALATY, J. L.; JOUVET, M. **Gestational caffeine modifies offspring behavior in mice.** Psychopharmacology, v. 75, p. 69-74, 1981.

SOBOTKA, T. J.; SPAID, S. L.; BRODIE, R. E. **Neurobehavioral teratology of caffeine exposure in rats.** Neurotoxicology (Park For. South), v. 1, p. 403 – 416, 1979.

SOUZA, R. A. G.; SICHERI, R. **Consumo de cafeína e prematuridade.** Revista de Nutrição, v. 8, n. 5, 2005.

SURTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. **Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.** J. Biol. Chem, v. 232, p. 1077 – 1091, 1958.

SCHRAUZER, G. N. **Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality.** *J Am Coll Nutr*, v. 21, p. 14-21, 2002.

TEODÓSIO, N. R. *et. al.* **A Regional Basic Diet From Northeast Brazil As A Dietary Model Of Experimental Malnutrition.** Guatemala: Archivos Latinoamericanos de Nutrition, v. 40, n. 4, p. 533-547, 1990.

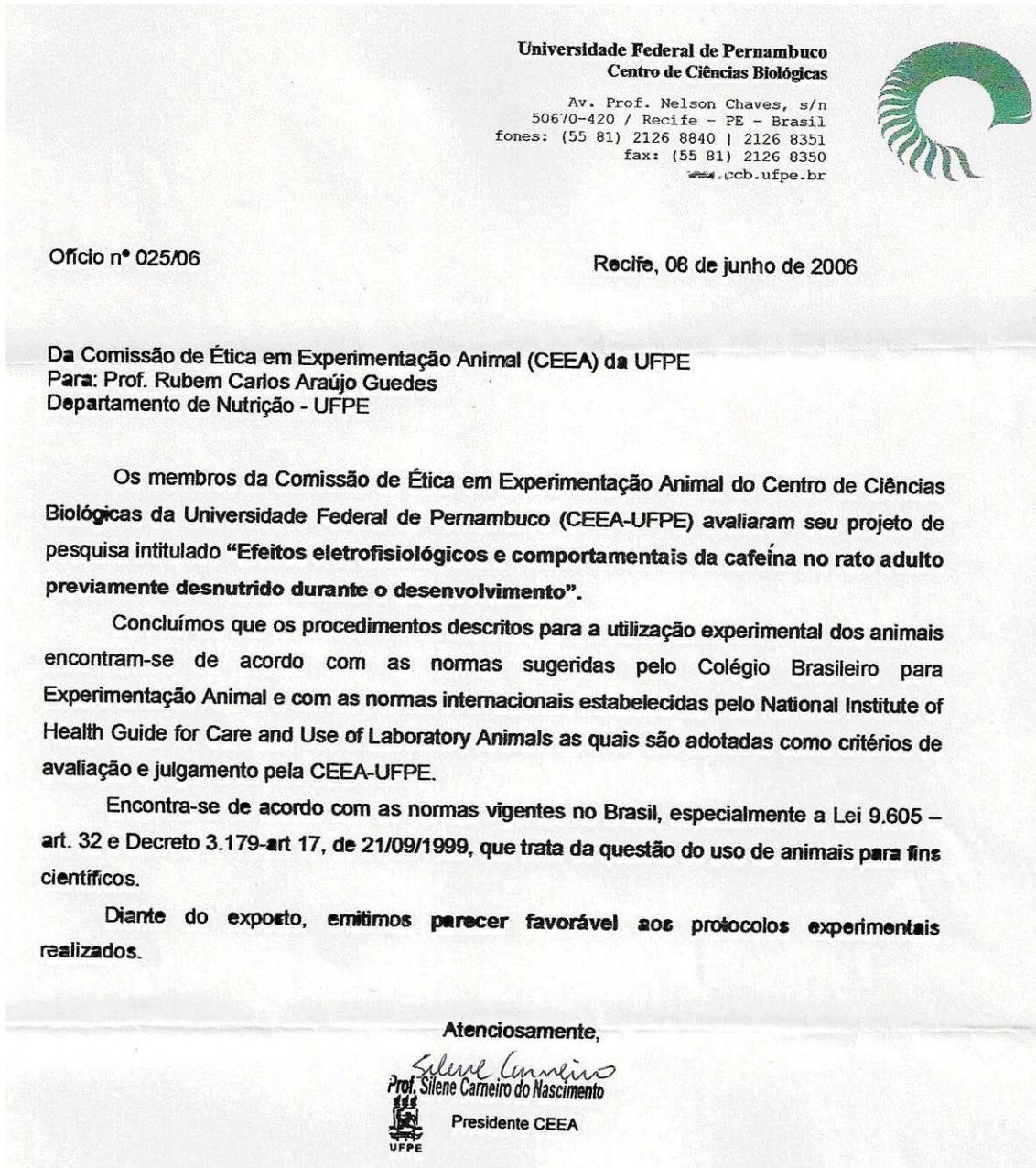
TURGEON, S. M. *et. al.* The **Delayed Effects of GTG and MK-801 on Latent Inhibition in Conditioned Taste-Aversion Paradigm**. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 66, p. 533-539, 2000.

WEINER, I. *et. al.* J. **Haloperidol- and clozapine-induced enhancement of latent inhibition with extended conditioning: implications for the mechanism of action of neuroleptic drugs**. Neuropsychopharmacology, v. 16 (1), p. 42-50, 1997.

WEINER, M. L. **Overview of lithium toxicology**. In: Schrauzer GN, Klippel KF, eds. "Lithium in Biology and Medicine." Weinheim: VCH Verlag, p. 83–99, 1991.

WINICK, M.; ROSSO, P.; BRASEL, J. A. **Malnutrition and Cellular Growth in The Brain: Existence of Critical Periods**. In Lipids, Malnutrition and the Developing Brain (anonymous), New York: Associated Scientific. p. 199-212, 1972.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



**ANEXO B – Documento de encaminhamento do artigo: “Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats”, ao periódico Nutritional Neuroscience.**

WEBMAIL UFPE

[https://www.webmail.ufpe.br/src/read\\_body.php?mailbox=INBOX&f](https://www.webmail.ufpe.br/src/read_body.php?mailbox=INBOX&f)



Pasta Atual: Entrada

[Lista de Mensagens](#) | [Apagar](#)

[Anterior](#) | [Próxima](#)

[Encaminhar](#) | [Encaminhar como anexo](#) | [Responder](#) | [Responder a todos](#)

**Assunto:** RE: Chandan, Rubem submitts new MS to NN

**De:** "Prasad, Chandan" <[Pprasad@mail.twu.edu](mailto:Pprasad@mail.twu.edu)>

**Data:** Ter, Dezembro 8, 2009 12:16 pm

**Para:** "rguedes@ufpe.br" <[rguedes@ufpe.br](mailto:rguedes@ufpe.br)>

**Prioridade:** Normal

[Ver cabeçalho completo](#) | [Ver Versão para Impressão](#) | [Baixar como um arquivo](#) | [Ver detalhes da mensagem](#) |

**Opções:** [Adicionar a lista de contatos](#)

MS#NN 65909/PD

Prof. R C A Guedes, MD, PhD  
Associate Editor - Nutritional Neuroscience  
Departamento de Nutrição  
Centro de Ciências Da Saúde  
Universidade Federal de Pernambuco  
50670-901 Recife/PE, BRASIL  
Telephone: +55-81-21268936  
FAX: +55-81-32718473, or +55-81-32718500  
E-mail: [rc.guedes@terra.com.br](mailto:rc.guedes@terra.com.br)

DATE RECEIVED: November 17, 2009, 2008; FIRST REVIEW COMPLETED: month 00, 2009;  
MANUSCRIPT ACCEPTED: Month 00, 2009.

AUTHOR(S): Márlison José Lima de Aguiar, Cilene Rejane Ramos Alves de Aguiar, Rubem Carlos Aradjo Guedes

TITLE: Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration  
impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats

Dear Author:

Thank you for submitting your manuscript to NUTRITIONAL NEUROSCIENCE. This is to acknowledge the receipt of the above manuscript. Your manuscript has been assigned to the following Associate Editor for review who should be contacted for progress.

Dra. Pilar Durán  
Dept. Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología  
Instituto de Neurobiología, UNAM  
Campus Juriquilla, Mexico  
E-mail: [pilis@servidor.unam.mx](mailto:pilis@servidor.unam.mx)

The office of the Associate Editor will give your manuscript a careful and prompt review and you will be notified as soon as the review process is complete.

Best regards,

Sincerely yours,

Chandan Prasad, PhD  
Editor-in-Chief  
\*\*\*\*\*  
Please visit Nutritional Neuroscience Website:  
<http://www.tandf.co.uk/journals/gb/1028415X.html> /  
\*\*\*\*\*

Nutritional Neuroscience is indexed in: Index Medicus/Medline; SciSearch (Science Citation Index-Expanded) or Current Contents; ISI Alerting Services (includes Research

**ANEXO C – Documento de encaminhamento do artigo: “Caffeine impairs latent inhibition, but not spreading depression in malnourished rats”, ao periódico Physiology & Behavior.**

Gmail - A manuscript number has been assigned: PHB-D-10-00081 - g...

<https://mail.google.com/mail/?ui=1#inbox>

The screenshot shows a Gmail inbox with the following details:

- Sender:** guedes.rca@gmail.com
- Subject:** A manuscript number has been assigned: PHB-D-10-00081
- Date:** 9 fev (1 dia atrás)
- Content Preview:**

Coletivo Geek Central | Geek.com.br - Nova versão do Flash Player respeitará privacidade dos usuários

« Voltar para Caixa de entrada Arquivar Denunciar spam Excluir Mover para Marcadores Mais ações » Próximas 27 de 635 Anteriores »

Dear Dr. Guedes,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number PHB-D-10-00081 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/phb/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: Rguedes

Thank you for submitting your manuscript to Physiology & Behavior.

Kind regards,

Physiology & Behavior

E-mail verificado pelo Terra Anti-Spam.  
Para classificar esta mensagem como spam ou não spam, visite <http://ecp.terra.com.br/cqi-bin/reportspam.cgi?<...>d=SCY5MVEMDQ113Blcm0hdGVycmEmMSwxMjY1NzAwNUUxLlU3MDc5MC4xNDQxLmNhYnJldGsuLnRlcJhLmNbSwyNDkxTerraMail>  
Verifique periodicamente a pasta Spam para garantir que apenas mensagens indesejadas sejam classificadas como Spam.

Esta mensagem foi verificada pelo E-mail Protegido Terra.  
Atualizado em 09/02/2010
- Bottom of the Email View:**

Responder Responder a todos Encaminhar

« Voltar para Caixa de entrada Arquivar Denunciar spam Excluir Mover para Marcadores Mais ações » Próximas 27 de 635 Anteriores »

Envie fotos facilmente pelo Gmail com o [organizador de fotos gratuito do Google](#). Saiba mais

Você está usando 815 MB (10%) de 7422 MB no momento.

Última atividade da conta: 21 horas atrás com o IP 187.113.128.250. [Detalhes](#)

Gmail - Visualização Padrão | Ativar bate-papo | Desativar buzz | Versão antiga | HTML básico | Saiba mais

©2010 Google - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#) - [Política de Privacidade do Google Buzz](#) - [Página inicial do Google](#)

# 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](#)