

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C DURANTE O
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: CORRELAÇÃO ENTRE A DOSE E
EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS NUTRIDOS E
DESNUTRIDOS

ROSÂNGELA FIGUEIREDO MENDES DA SILVA

Orientador:

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

RECIFE
2014

ROSÂNGELA FIGUEIREDO MENDES DA SILVA

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C DURANTE O
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: CORRELAÇÃO ENTRE A
DOSE E EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS NUTRIDOS
E DESNUTRIDOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco, sob orientação do Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes

RECIFE
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Rosângela Figueiredo Mendes da
Suplementação com vitamina C durante o desenvolvimento cerebral:
correlação entre a dose e efeitos eletrofisiológicos em ratos nutridos e
desnutridos/ Recife: O Autor, 2014.

63 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Antioxidantes 2. Vitamina C 3. Cérebro I. Guedes, Rubem Carlos**
Araújo (orientador) II. Título

613.286

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 180

ROSÂNGELA FIGUEIREDO MENDES DA SILVA

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C DURANTE O
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: CORRELAÇÃO ENTRE A
DOSE E EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS NUTRIDOS
E DESNUTRIDOS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por:

Rubem Carlos Araújo Guedes
Orientador

Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues

Ranilson de Souza Bezerra

Data: 19 / Fevereiro/ 2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter me dado forças nos momentos mais complicados;

À minha mãe Marilene, por estar sempre presente, me apoiar e compreender/aguentar os períodos de estresse;

Ao meu pai Jairo, pelo amor, apoio e preocupação de sempre;

Aos meus irmãos, Roseli, Roseane e Rodrigo, por todo incentivo e pelos bons momentos juntos;

À minha pequena e querida sobrinha Júlia, que torna meus dias alegres com o sorriso inocente de todos os dias;

Ao professor Rubem Guedes, quem eu tanto admiro como profissional e ser humano; muito obrigada por estar sempre presente e disposto a esclarecer dúvidas, é uma imensa honra tê-lo como orientador;

À profa. Belmira Lara, muito obrigada pela paciência e ensinamentos;

Agradeço a todos do LAFINNT que tornam o ambiente de trabalho agradável com conversas e cooperação. Meus imensos agradecimentos à Andréia, pelo companheirismo e parceria de sempre! Agradeço à Regina pela amizade e carinho; e pelo apoio de Cássia, Denise, Elian, Geórgia, Manuella, Mariana, Noranege, Paula, Ricardo e Thays.

Agradeço a ajuda de minhas queridas estagiárias Maria Eduarda, Gabriela e Ana Rafaela.

À Ricielle e Alinny, pela paciência e ajuda em todos os momentos que estive no Laboratório de Neurofisiologia.

Agradeço a todos os meus amigos. Em especial àqueles que acompanharam esta etapa e entenderam minha ausência em alguns momentos: Andreza, Camila, Diego, Díocles, Ewerton, Lícia, Priscila, Paulo, Yasmin.

À Luciana e Márcia, pela amizade incondicional. Agradeço também aos seus pais (Leucia, Márcia, Wilson), por todo apoio.

À pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia e aos órgãos de fomento: FACEPE, CNPq.

Agradeço ao Sr. França pelo auxílio durante a pesquisa e fornecimento dos animais. E à Ana França, pelo auxílio na preparação da dieta (DBR).

Enfim, sou grata a todos que participaram desta etapa e fizeram com que este trabalho fosse realizado!

RESUMO

A vitamina C, ou ácido ascórbico (AA) é um nutriente encontrado em grande concentração no cérebro, sendo amplamente conhecido por sua ação antioxidante. Entretanto, seu efeito sobre o sistema nervoso central parece ser dependente da dose empregada, podendo facilitar a oxidação, sob certas condições. Neste trabalho, investigamos os efeitos da administração crônica de doses crescentes de AA sobre a excitabilidade neural de animais em desenvolvimento. Os efeitos foram avaliados a partir da depressão alastrante cortical (DAC) e dos níveis de malondialdeído (MDA) induzido por peroxidação lipídica. Ratos nutridos e desnutridos foram tratados com 30, 60 e 120 mg/kg/dia de AA do 7º ao 28º dia pós-natal e o registro da DAC, bem como a medida dos níveis cerebrais de MDA, foram realizados entre 30-40 dias de vida. Confirmando achados prévios, as velocidades de propagação da DAC foram significativamente maiores nos animais desnutridos do que nos nutridos. Em comparação aos controles (salina e ingênuo), na mesma condição nutricional, a velocidade de propagação da DAC e os níveis de MDA diminuíram após o tratamento com baixa dose de AA (30 mg/kg/dia), enquanto que com doses mais elevadas (60 e 120 mg/kg/dia) a velocidade da DAC e os níveis de MDA foram aumentados. Nossos achados sugerem que a atuação do AA no cérebro seria dependente da dose, agindo como antioxidante em baixas doses, e como pró-oxidante quando administrado em altas doses.

Palavras-chave: Moléculas antioxidantes; Ácido ascórbico; Depressão alastrante cortical; Moléculas pró-oxidantes; Desnutrição; Desenvolvimento cerebral.

ABSTRACT

Vitamin C, or ascorbic acid (AA) is a nutrient found in high concentration in the brain, widely known for its antioxidant activity. However, its effect on the central nervous system seems to be dependent on the dose employed, which may facilitate oxidation under certain conditions. In this work, we investigated the effects of chronic administration of AA on the neural excitability in developing animals. The effects of different doses of AA on the brain were evaluated from the cortical spreading depression (CSD) phenomenon and the levels of lipid peroxidation-induced malondialdehyde (MDA). Well-nourished and malnourished rats were treated with 30, 60 and 120 mg/kg/d of AA from the 7th to the 28th postnatal day and CSD record and the levels of MDA were carried out between 30-40 days of life. Confirming previous findings, the CSD velocities of malnourished animals were significantly higher than the corresponding nourished. Compared to controls groups (saline and naïve), in the same nutritional condition, the CSD velocity and MDA levels decreased after treatment with low dose of AA (30 mg/kg/d), whereas high doses (60 and 120 mg/kg/d) increased the CSD velocity and MDA levels. Our findings suggest that the role of AA in the brain would be dose-dependent. Acting as an antioxidant at low doses, and as prooxidant when administered at high doses.

Key words: Antioxidant molecules; Ascorbic acid; Cortical spreading depression; Prooxidant molecules; Malnutrition; Brain development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.

Estrutura molecular do ácido L-ascórbico..... 14

Figura 2.

Biossíntese do ácido L-ascórbico em animais..... 15

Figura 3.

Vias de entrada de ascorbato no SNC. 16

Figura 4.

Comparação entre as etapas de desenvolvimento do sistema nervoso no homem e no rato. ... 20

Figura 5.

Esquema do “ciclo da depressão alastrante cortical” 24

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1.

Peso corporal dos animais 46

Figura 2.

Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante cortical. 47

Figura 3.

Velocidade de propagação da depressão alastrante cortical..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.

Composição percentual da “Dieta Básica Regional”(DBR)..... 22

Tabela 2.

Algumas condições que dificultam a propagação da depressão alastrante cortical..... 25

Tabela 3.

Algumas condições que facilitam a propagação da depressão alastrante cortical..... 26

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1.

Amplitude e duração da variação lenta de voltagem da DAC..... 49

Tabela 2.

Níveis de malondialdeído no córtex cerebral 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
ASC	Ascorbato
DAC	Depressão alastrante cortical
DBR	Dieta básica regional
DHA	Dehidroascorbato
EEG	Eletroencefalograma
GLUT 1	Transportador de glicose 1
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MDA	Malondialdeído
SCVT 2	Transportador de vitamina C dependente de sódio tipo 2
SNC	Sistema nervoso central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLV	Variação lenta de voltagem

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
VITAMINA C	13
VITAMINA C E ESTRESSE OXIDATIVO	17
VITAMINA C E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL	19
DESNUTRIÇÃO.....	21
DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	23
OBJETIVOS	27
Geral.....	27
Específicos	27
REFERÊNCIAS.....	28
ARTIGO PUBLICADO	39
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
ANEXO 01 – Parecer aprobatório da Comissão de Ética.....	63

INTRODUÇÃO

A vitamina C (ácido ascórbico – AA) é um nutriente hidrossolúvel encontrado em altas quantidades nas glândulas adrenais e no cérebro, com importante ação durante o desenvolvimento do sistema nervoso (ZALANI et al., 1989). Em sua forma ionizada, denominada ascorbato, o AA exerce uma ação redutora sobre os radicais livres, atuando como antioxidante.

Apesar do amplo uso do AA como antioxidante, seu efeito no sistema nervoso tem aspectos controversos. Alguns trabalhos têm demonstrado que o ascorbato pode exercer uma ação modulatória bifásica dependente da dose empregada, podendo atuar como pró-oxidante em certas situações (AYDOGAN et al., 2008). Em estudos prévios de nosso grupo, este efeito pró-oxidante foi demonstrado em ratos jovens tratados com uma dose de 60 mg/kg/dia de AA por três semanas (7 a 28 dias de vida). Estes animais, quando comparados aos controles, apresentaram um aumento da velocidade de propagação do fenômeno relacionado à excitabilidade, conhecido como depressão alastrante cortical (DAC).

A DAC pode ser descrita como uma resposta do tecido cerebral na forma de uma “onda” propagável, de depressão da atividade elétrica cortical espontânea, sendo essa resposta reversível (LEÃO, 1944). A DAC pode ser provocada por estimulação elétrica, mecânica ou química, de um ponto do tecido, e tal onda propaga-se lentamente por todo o córtex (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min). A atividade elétrica começa a recuperar-se a partir do ponto estimulado, sendo o fenômeno totalmente revertido ao final de 5 a 10 minutos. Simultaneamente à depressão da atividade elétrica espontânea, ocorre uma variação lenta de voltagem (VLV), na região cortical invadida pela DAC (LEÃO, 1947). A DAC é modulada por alterações na excitabilidade cerebral (KOROLEVA; BURES, 1980), e é influenciada pela produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cerebral (EL-BACHÁ et al., 1998). Este fenômeno vem sendo utilizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), como modelo experimental para avaliar a excitabilidade cortical. Esta tem sido avaliada em diversas situações de interesse clínico, envolvendo variáveis nutricionais (ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997), hormonais (ACCIOLY et al., 2012), ambientais (BATISTA-

DE-OLIVEIRA et al., 2012) e farmacológicas (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013; GUEDES et al., 2002).

A desnutrição pode alterar a organização eletrofisiológica do sistema nervoso tanto em animais de laboratório (CHEN et al., 1997; MORGANE et al., 1978) quanto em humanos (GRANTHAM-MCGREGOR, 1995; LEVITSKY; STRUPP, 1995). Durante o início da vida, alterações nutricionais podem ocasionar a produção excessiva de radicais livres no tecido cerebral (EL-BACHÁ et al., 1998; GUEDES et al., 1996a) bem como alterações eletrofisiológicas permanentes (ROCHA-DE-MELO et al., 2006).

Neste trabalho, nós utilizamos registros eletrofisiológicos da DAC para avaliar o efeito da suplementação de crescentes doses de AA durante o período do desenvolvimento cerebral de ratos jovens. Nossa hipótese é de que a propagação da DAC, bem como os níveis cerebrais de malondialdeído consequentes à peroxidação lipídica, seriam afetados pelo ácido ascórbico de forma dose-dependente.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

VITAMINA C

A vitamina C, nomenclatura popular do ácido ascórbico (AA), é um nutriente hidrossolúvel encontrado em altas concentrações nas glândulas adrenais e no cérebro (HORNING, 1975; RICE, 2000). Fisiologicamente, o AA é co-fator para enzimas hidroxilases e monooxigenases que estão envolvidas na síntese de colágeno, carnitina e neurotransmissores (LEVINE, 1986; NAIDU, 2003). Sua atuação como co-fator na síntese de colágeno é essencial para os processos de mielinização e diferenciação das células de Schwann (ELDRIDGE et al., 1987). Estudos demonstram que o AA exerce uma importante ação comportamental, seja como um possível mediador dos processos de aprendizagem e memória (SHAHIDI et al., 2008), seja como agente restaurador dos danos de memória provocados pela idade (PARLE; DHINGRA, 2003).

Dentre os papéis fisiológicos da vitamina C, sua atuação como ascorbato (sua forma ionizada) é a mais conhecida. O ascorbato atua como poderoso antioxidante, doando 2 elétrons (transformando-se em dehidroascorbato), impedindo a oxidação de outros compostos (figura 1) (RICE, 2000).

Em sua atuação como antioxidante, podemos ressaltar sua capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (JACKSON et al., 1998). Igualmente, o AA tem papel fundamental na reciclagem do radical α -tocoferoxil. O ácido ascórbico reduz o α -tocoferoxil em α -tocoferol (vitamina E) na superfície da bicamada lipídica das células (NIKI et al., 1995), o que pode ser associado à prevenção da peroxidação lipídica (SEREGI et al., 1978).

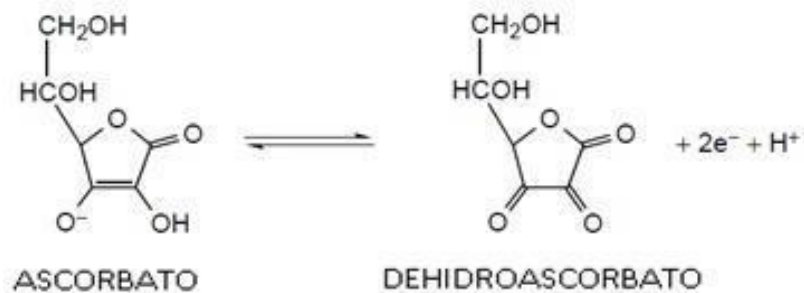


Figura 1 Estrutura molecular do ácido L-ascórbico como ânion monovalente (ascorbato) e o produto de sua oxidação (dehidroascorbato), pela perda de dois elétrons e um próton (modificado de RICE, 2000).

No sistema nervoso o AA exerce outras funções além da de antioxidante. A neuromodulação é uma das atividades não antioxidantes exercidas pela vitamina C nos processos de neurotransmissão mediados por glutamato, acetilcolina e dopamina (KUO et al., 1979; REBEC; PIERCE, 1994; RICE, 2000). Apesar dos mecanismos não estarem plenamente esclarecidos, sabe-se que em todas as suas funções o AA atua como doador de elétrons (HARRISON; MAY, 2009).

Os seres humanos e outros primatas são incapazes de sintetizar o AA, pois a perda da enzima gulonolactona oxidase impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose (NAIDU, 2003; ver figura 2). Sendo assim, a presença de vitamina C na dieta é indispensável para a manutenção do organismo dos seres humanos, e sua carência pode causar a doença escorbuto.

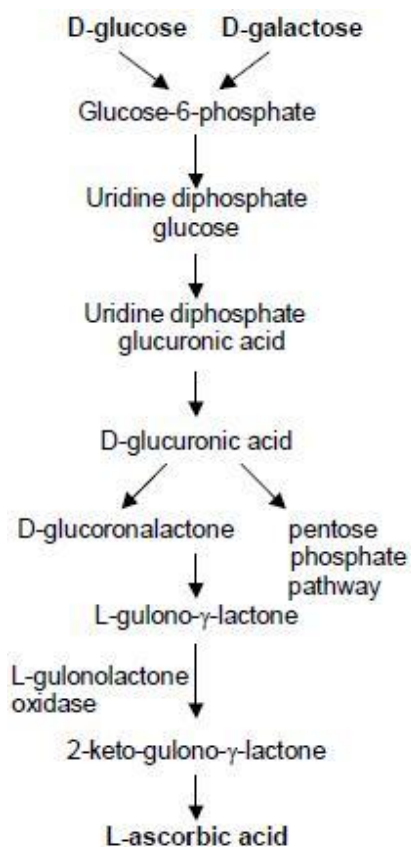


Figura 2 Biossíntese do ácido L-ascórbico em animais (NAIDU, 2003).

A principal via de entrada da vitamina C no sistema nervoso central (SNC) ocorre a partir do “transportador de vitamina C dependente de sódio tipo 2” (SCVT 2). O SCVT 2 é responsável pelo transporte do ascorbato do plasma para o líquido cefalorraquidiano (LCR), através do epitélio do plexo coroide. Além do transporte via SCVT 2, o AA pode entrar rapidamente no LCR na forma de dehidroascorbato (DHA), a partir do transportador de glicose 1 (GLUT 1), através da barreira hemato-encefálica (HARRISON; MAY, 2009).

A alta concentração intracelular do AA no SNC é mantida pelo transporte via SCVT 2, encontrado apenas em neurônios. Em astrócitos, a entrada de ascorbato é menor, pois ocorre apenas pelo GLUT1 (na forma de DHA), o que pode explicar a diferença de concentração de ascorbato em neurônios e células gliais (respectivamente, 10 mM e 1 mM) (HARRISON; MAY, 2009; ver figura 2).

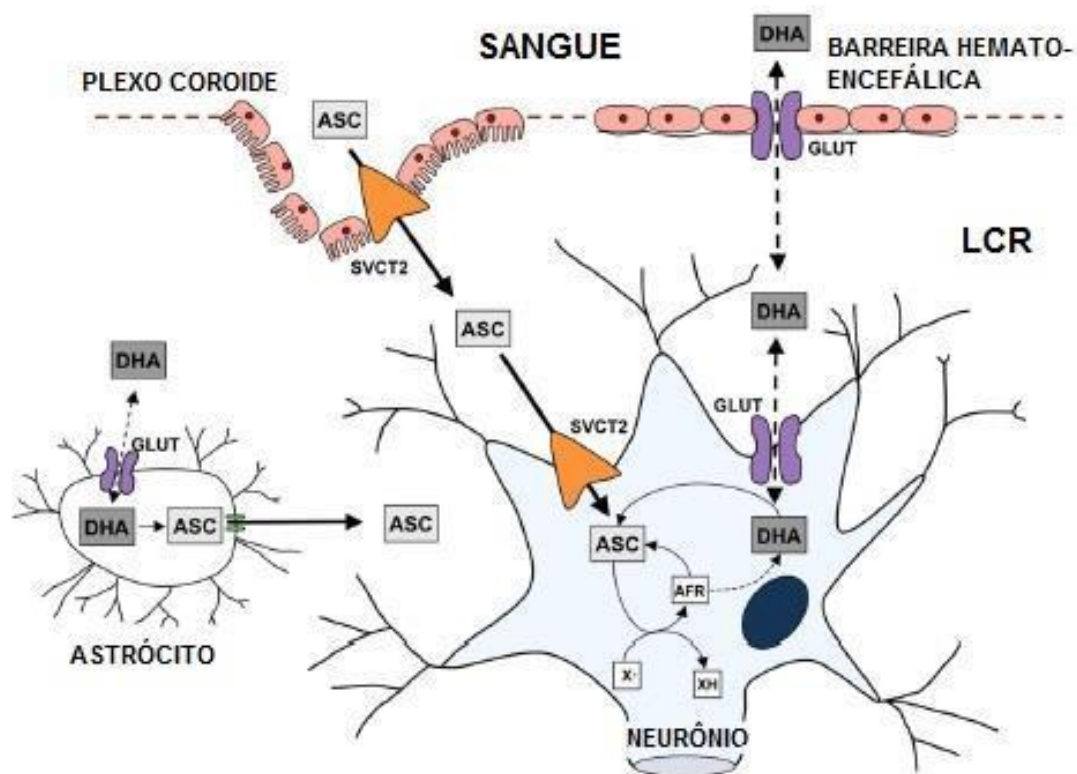


Figura 3 Vias de entrada de ascorbato (ASC) no SNC. ASC: ascorbato; AFR: radical livre ascorbato; DHA: dehidroascorbato; LCR: líquido cefalorraquidiano; X $\cdot$: espécies de radicais livres oxidantes. O ascorbato entra no LCR via SVCT2 através do plexo coroide, ou como DHA via GLUT através da barreira hemato-encefálica. Similarmente, o ASC entra no neurônio via SCVT2 ou como DHA via GLUT. As células gliais obtêm ascorbato apenas de forma indireta, a partir da entrada de DHA via GLUT, enquanto os neurônios recebem ASC diretamente via SVCT2. (Modificado de HARRISON; MAY, 2009).

VITAMINA C E ESTRESSE OXIDATIVO

Em 1991, Sies definiu estresse oxidativo como “*um distúrbio no balanço pró-oxidante – antioxidante a favor do primeiro, levando a danos em potencial*”. O dano ocasionado pelo estresse oxidativo foi denominado por Halliwell e Whiteman (2004) como “*o dano biomolecular causado pelo ataque de espécies reativas sobre os constituintes celulares de organismos vivos*”.

O cérebro é um dos órgãos mais sensíveis a danos oxidativos; dentre os fatores que acarretam esta sensibilidade podemos citar: (1) a presença de aminoácidos excitotóxicos no cérebro (ex.: glutamato); (2) a produção do ânion superóxido (O_2^-) pela mitocôndria neuronal; (3) o fato de que diversos neurotransmissores são auto-oxidáveis (dopamina, serotonina e noradrenalina podem reagir com O_2 e gerar O_2^-); (4) a presença de ferro em todo o cérebro (ferro e cobre aceleram a peroxidação lipídica); (5) a geração de elevada quantidade de H_2O_2 pelo o metabolismo cerebral; (6) defesas antioxidantes relativamente baixas (HALLIWELL, 2006).

As espécies reativas têm participação direta nos mecanismos que medeiam distúrbios neurológicos. Na doença de Alzheimer, o estresse oxidativo contribui para a degeneração do sistema colinérgico do cérebro anterior basal e morte celular em geral (MONTINE et al., 2002; PRATICO, 2002), enquanto que na doença de Huntington os radicais livres influenciam na perda de neurônios no estriado, ocasionando déficits motores e cognitivos. Em relação à epilepsia, estudos demonstraram que espécies reativas de oxigênio estão envolvidas nos mecanismos de neurodegeneração que ocorrem em modelos experimentais utilizando a pilocarpina (FREITAS, 2009; XUE et al., 2011).

Os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo podem ser prevenidos por antioxidantes (MURASHIMA, 1998; SIMEONE et al., 2014). A administração oral de ascorbato protegeu a área CA1 do hipocampo de ratos contra o estresse oxidativo e liberação de citocinas induzidos por injeção de β -amilóide fibrilar (modelo para doença de Alzheimer) (ROSALES-CORRAL et al., 2003). O AA também foi capaz de reduzir os efeitos deletérios da administração de MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; modelo parkinsoniano) em cerca de 20% (WAGNER et al., 1986); assim como produziu uma melhora nos comportamentos repetitivos de camundongos geneticamente modificados para apresentarem doença de Huntington (REBEC et al., 2003). Em estudo recente demonstrou-se que uma administração única de ácido

ascórbico foi capaz de antagonizar as alterações do equilíbrio redox do cérebro (aumento da produção de radicais livres) e da excitabilidade cerebral (indução de convulsões), produzidas pela pilocarpina (DONG et al., 2013).

Entretanto, sua ação sobre o sistema nervoso ainda é bem controversa, podendo atuar como pró-oxidante (HALLIWELL, 1996; SONG, 2001). Apesar do amplo conhecimento sobre a ação antioxidante do AA sobre o cérebro, alguns trabalhos têm demonstrado que o ascorbato pode exercer uma ação modulatória bifásica, podendo atuar como pró-oxidante em certas situações. Por exemplo, a administração de 60 mg/kg/dia de vitamina C em ratos aumentou o estresse oxidativo induzido por bisphenol A, nonylphenol and octylphenol (desreguladores endócrinos) (AYDOGAN et al., 2008). A administração desta mesma dose de AA aumentou a velocidade de propagação do fenômeno eletrofisiológico denominado depressão alastrante cortical (MONTE-GUEDES et al., 2011). Além disso, estudos utilizando a DAC, realizados com outros fatores pró e antioxidantes (ver GUEDES et al., 2012), demonstram que o aumento da velocidade de propagação da DAC pode estar associado a um efeito pró-oxidante.

VITAMINA C E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

A concentração de vitamina C, em ratos, encontra-se elevada no período fetal e início da vida pós-natal, e diminui ao longo do envelhecimento, indicando uma importância da ação do AA durante o período de desenvolvimento cerebral (RICE, 2000; ZALANI et al., 1989). A maior quantidade de ascorbato durante o período crítico de desenvolvimento pode ser explicada pela necessidade da sua função como antioxidante, pois nos estágios iniciais da vida há intensa organogênese e maturação neuronal resultando em elevado estresse oxidativo (MEREDITH et al., 2011).

O elevado teor de vitamina C no córtex cerebral em ratos recém-nascidos atinge o ápice ao 3º dia de vida pós-natal, período no qual o tecido cortical é formado principalmente por neurônios, pois a população de células gliais ainda encontra-se reduzida. Ao longo das primeiras semanas de vida, os níveis de ascorbato na área cortical decaem paralelamente ao período de gliogênese cortical. No cerebelo os níveis de AA são constantes até o 9º dia pós-natal, a partir deste ponto há um intenso aumento de AA tecidual que coincide com a proliferação de células granulares cerebelares (ALTMAN, 1972). O nível máximo de ascorbato no cerebelo ocorre no 15º dia de vida pós-natal, e então há uma redução gradual do teor de ascorbato até atingir os níveis normais da fase adulta (RICE, 2000).

Nas fases iniciais da vida o sistema nervoso encontra-se susceptível a alterações nutricionais e do equilíbrio redox. Durante este período, o sistema nervoso é submetido a processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização, que estão ocorrendo em máxima velocidade. Este período de grande vulnerabilidade é denominado como “período de crescimento rápido do cérebro” ou “período crítico de desenvolvimento” (ALMEIDA et al., 2002; GUEDES, 2005; MORGANE et al., 1978).

Nos seres humanos, esta fase crítica se inicia no terceiro trimestre da gestação, e se estende até os primeiros dois a quatro anos de vida. No rato albino, o mamífero mais usado para estudos experimentais sobre o tema, ela compreende as três primeiras semanas de vida pós-natal, ou seja, o período do aleitamento (SMART; DOBBING, 1971; ver figura 1).

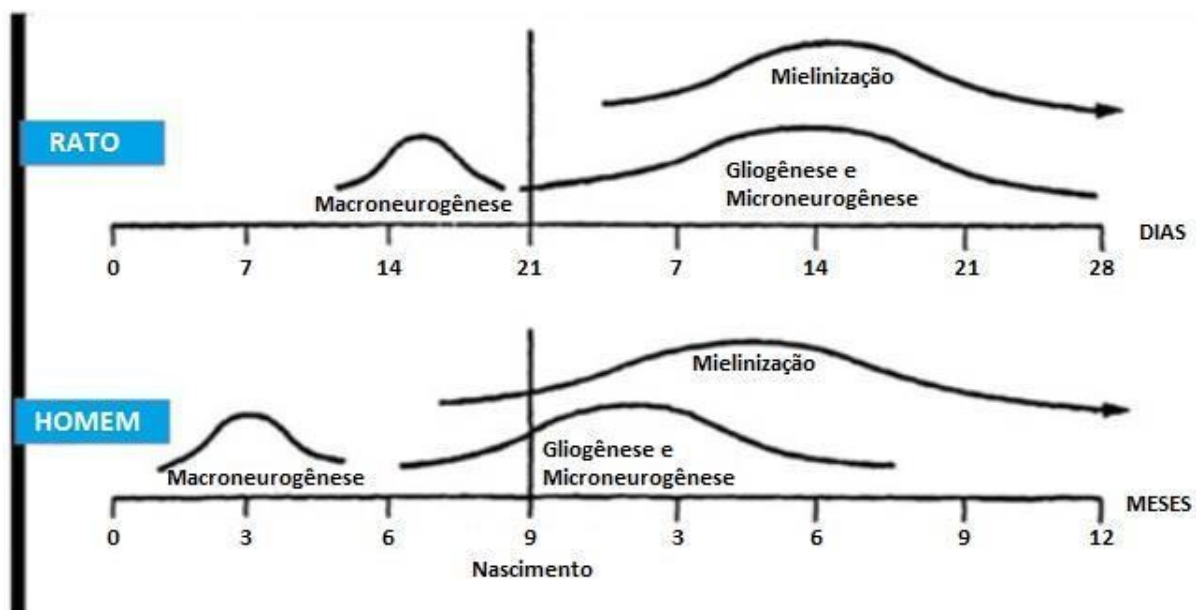


Figura 4 Comparação entre as etapas de desenvolvimento do sistema nervoso no homem e no rato. (adaptado de MORGANE et al., 1993)

DESNUTRIÇÃO

A desnutrição pode ser causada por uma dieta desbalanceada ou deficiente de nutrientes necessários para manutenção do organismo, sendo comum nesta condição clínica a carência de fatores antioxidantes, tais como a vitamina C, cuja falta pode afetar o “equilíbrio redox” do cérebro (MONTE-GUEDES et al, 2011). O estado nutricional do organismo exerce um papel importante durante o crescimento e desenvolvimento do SNC, alterando suas estruturas e funções (SCHWEIGERT et al., 2009).

Há uma década, países em desenvolvimento, como o Brasil, vêm vivenciando o fenômeno da “transição nutricional”. Esta se caracteriza por redução nas taxas de desnutrição e concomitante aumento nas de obesidade (BATISTA-FILHO; RISSIN, 2003). Apesar dessa tendência, a desnutrição ainda é considerada um problema mundial de saúde pública.

Diversos estudos experimentais demonstram que a desnutrição, durante o período crítico de desenvolvimento, provoca alterações anatômicas e fisiológicas no encéfalo (MORGANE et al., 1993; ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997), bem como estimula a produção excessiva de radicais livres no tecido cerebral (GUEDES et al., 1996b; EL-BACHÁ et al., 1998). Tais alterações são refletidas em prejuízos cognitivos e comportamentais, e dependendo da intensidade/tipo de desnutrição causados, os efeitos deletérios podem persistir por longo prazo ou tornarem-se permanentes (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; GUEDES, 2011; ROCHA-DE-MELO et al., 2006).

O uso de modelos experimentais que mimetizam a desnutrição é uma maneira eficiente para aprofundar o seu estudo. A “Dieta Básica Regional” (DBR) tem sido utilizada como um modelo para provocar desnutrição severa. É caracterizada por níveis reduzidos de minerais, vitaminas e lipídios, e possui uma grande deficiência proteica tanto em quantidade como em qualidade. Foi desenvolvida com base nos alimentos regionais consumidos pela população do nordeste brasileiro na década de 60, época em que a desnutrição, nesta região, acometia boa parte da população (TEODÓSIO et al., 1990). A DBR é composta por feijão, farinha de mandioca, charque e batata doce, apresentando baixos teores de proteína (8%), e níveis elevados de fibras (TEODÓSIO et al., 1990; ver tabela 1).

Tabela 1. Composição percentual da “Dieta Básica Regional” (DBR). Exceto pela última coluna da direita, os números representam g/100g da dieta (adaptado de Teodósio et al., 1990).

INGREDIENTES	g/100g	PROTEÍNA	CARBOIDRATO	CORDURA	FIBRA	Kcal % (Kcal em 100g da dieta)
Feijão mulatinho	18,34	3,99	10,66	0,24	1,09	60,76
Farinha de mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	5,64	198,80
Charque	3,74	2,74	-	0,06	-	11,50
Gordura da charque	0,35	-	-	0,35	-	3,15
Batata doce	12,76	0,30	9,99	0,03	0,48	41,43
	100,00	7,87	69,24	0,80	7,21	315,64

Durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso a DBR causa o aumento da excitabilidade do córtex cerebral (GUEDES et al, 1987; TEODÓSIO et al., 1990), causando déficit no crescimento e desenvolvimento do animal. Além disso, o desenvolvimento da prole também é afetado pelo aumento do estresse oxidativo placentário gerado por uma desnutrição materno-fetal induzida pela DBR (VIEIRA-FILHO, et al., 2009).

Os efeitos da desnutrição sob o SNC têm sido extensamente estudados através do fenômeno eletrofisiológico da DAC (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; GUEDES et al. 1987; GUEDES et al. 2013; MONTE-GUEDES et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A Depressão Alastrante Cortical (DAC) foi descrita pela primeira vez, em coelhos anestesiados, como uma onda propagável de depressão (redução) da atividade elétrica cortical espontânea (LEÃO, 1944). Tal fenômeno ocorre pela súbita perda de resistência da membrana e de gradientes iônicos; havendo assim uma intensa despolarização das membranas neuronais e gliais. É caracterizada pela interrupção de todas as atividades sinápticas, sejam elas espontâneas ou evocadas; e pelo intenso efluxo de potássio (K^+), elevando a concentração externa do íon de 3-4 mM para mais de 40 mM. (EIKERMANN-HAERTER; AYATA, 2010).

Tal depressão eletrofisiológica pode ser provocada por estimulação elétrica, mecânica ou química, de um ponto do tecido cortical, alastrando-se de forma centrífuga por toda massa cinzenta, independente de divisões funcionais e territórios arteriais (SOMJEN, 2001).

A atividade elétrica cerebral pode ser visualizada por diferentes técnicas laboratoriais, dentre essas técnicas o eletroencefalograma (EEG) é uma forma valiosa de obter o registro da atividade simultânea de milhares de neurônios localizados em uma específica região cerebral. O EEG é obtido a partir da diferença de potencial elétrico entre eletrodos situados em diferentes regiões cerebrais. Em humanos é uma técnica não invasiva, utilizada no diagnóstico de doenças neurológicas; enquanto que em estudos com animais, os eletrodos podem ser colocados sobre a dura-máter, em pequenos orifícios perfurados no crânio, sob anestesia, registrando-se a atividade elétrica do córtex cerebral [eletrocorticograma (EcoG)].

Simultaneamente à depressão da atividade elétrica espontânea, foi descrita uma variação lenta de voltagem (VLV) negativa na região cortical onde estava ocorrendo a DAC (LEÃO, 1947). Em ratos, esta variação de voltagem atinge de -5 a -20 mV, 1 a 2 minutos após seu início, sendo revertida após alguns minutos (GUEDES, 2011; LAURITZEN, 1994). Esta VLV, que é o evento característico da DAC, pode ser mensurada a partir da diferença de potencial entre o local onde está ocorrendo a DAC e um ponto fixo, como os ossos nasais. A VLV é um fenômeno do tipo “tudo ou nada”, sendo utilizada para o cálculo da velocidade de propagação da DAC.

A susceptibilidade cerebral à DAC pode ser estimada pela velocidade de propagação do fenômeno ao longo do tecido cortical. Quando comparada à velocidade de propagação do potencial de ação neuronal (da ordem de metros por segundo), a

velocidade da DAC é consideravelmente mais baixa, da ordem de 2 a 5 mm/min, em todos os vertebrados já estudados (GUEDES, 2005). O padrão de propagação da DAC parece ser mais compatível com um mecanismo humoral ao invés de um mecanismo baseado em correntes iônicas rápidas, tal como o potencial de ação. Esse mecanismo seria baseado na liberação de um ou mais fatores químicos pelas células neurais, no momento em que elas fossem submetidas à DAC. Assim, à medida que esses compostos se difundissem através do espaço extracelular, como consequência da DAC, eles "contaminariam" as células vizinhas, deflagrando então, nelas, o fenômeno. Estas células uma vez "deprimidas" eletricamente, também passariam a liberar estes mesmos fatores, que contaminariam outras células, e assim por diante, dando lugar a uma propagação automantida e sustentada (LEHMENKÜHLER; RICHTER, 1993).

À medida que a propagação ocorre de forma concêntrica por todo o córtex, a atividade elétrica começa a recuperar-se a partir do ponto cortical estimulado; e ao final de 5 a 10 minutos o tecido cortical encontra-se totalmente recuperado, indicando assim, que se trata de um fenômeno totalmente reversível (Figura 2).

Alguns autores postulam que o tecido nervoso apresenta uma resistência natural à DAC; entretanto tal resistência pode ser atenuada ou fortalecida em diversas condições clínicas, modificando assim a velocidade de propagação do fenômeno (GUEDES; DO-CARMO, 1980; LEÃO, 1972).

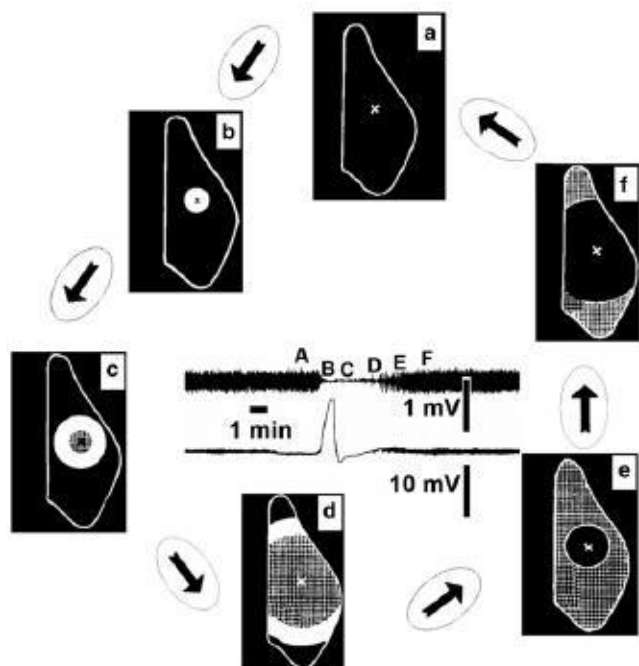


Figura 5 Esquema do “ciclo da depressão alaistrante cortical” (a-f), no qual “a” demonstra o córtex normal, “b” o ponto de estimulação marcado com o x (na área branca está ocorrendo a depressão da atividade cerebral), “c” e “d” a propagação do fenômeno por todo córtex, “e” início da recuperação da local de estímulo, “f” quase todo córtex inteiramente recuperado. (Adaptado de GUEDES, 2011)

Dentre as condições clínicas que alteram a propagação da DAC, podemos citar:

(i) variáveis nutricionais (ANDRADE et al., 1990; GUEDES et al., 1987; GUEDES et al., 1992; ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO et al, 2006), (ii) hormonais (ACCIOLY, 2012; GUEDES; PEREIRA-DA-SILVA, 1993), (iii) ambientais (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al, 2012; MONTE-SILVA et al, 2007; SANTO-MONTEIRO et al, 2000; TENÓRIO et al, 2009;) e (iv) farmacológicas (AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al, 2006; 2013; GUEDES et al, 1987).

As Tabelas 2 e 3 apresentam diversas condições, já disponíveis na literatura, que podem dificultar ou facilitar a propagação da DAC.

Tabela 2. Algumas condições que dificultam a propagação da DAC

<i>Condição experimental</i>	<i>Autor/Ano</i>
Tratamento dietético com lítio	GUEDES et al., 1989
Hiperglicemia	XIMENES-DA-SILVA; GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ et al., 2001
Anestésicos	GUEDES; BARRETO, 1992
Hipotireoidismo	GUEDES; PEREIRA-DA-SILVA, 1993
Envelhecimento	GUEDES et al., 1996b
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	GUEDES; CAVALHEIRO, 1997; COSTA-CRUZ et al., 2006
Estimulação ambiental	SANTOS-MONTEIRO et al., 2000
Ativação do sistema serotoninérgico	GUEDES et al., 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006
Estimulação elétrica cerebral direta e trans- craniana	FREGNI et al., 2005; 2007
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Dieta hiperlipídica	PAIXÃO et al., 2007
Tratamento com triptofano (precursor da serotonina)	TRINDADE-FILHO et al, 2009
Deficiência, na dieta, de ácidos graxos essenciais	BORBA et al., 2010
Abolição da função ovariana (castração) no início da vida	ACCIOLY et al, 2012
Tratamento com o antagonista opioide Naloxona	GUEDES et al, 2013

Tabela 3 Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

<i>Condição experimental</i>	<i>Autor/Ano</i>
Redução do cloreto extracelular	GUEDES; DO-CARMO, 1980
Privação do sono paradoxal	VASCONCELOS et al, 2004
Diazepam	GUEDES et al., 1992
Etanol	GUEDES; FRADE, 1993; ABADIE-GUEDES et al, 2012
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001
Privação sensorial	TENÓRIO et al., 2009
Arginina durante o desenvolvimento	MAIA et al, 2009
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS et al., 2009
Glutamina durante o desenvolvimento	LIMA et al, 2009
Uso de dipirona no início da vida	AMARAL et al., 2009
Tratamento crônico com 60mg/kg de ác.	MONTE-GUEDES et al, 2011
Ascórbico	
Tratamento com glutamato monossódico	LIMA et al., 2013
Tratamento com o antagonista serotoninérgico tianeptina	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al, 2013

*DBR

Estudos sugerem que a baixa oferta dietética de substâncias antioxidantes leve à produção excessiva de radicais livres no tecido cerebral, o que facilita a propagação da DAC (EL-BACHÁ et al., 1998; GUEDES et al., 1996b). Por outro lado, a administração de antioxidantes combate o excesso de espécies reativas de oxigênio provocado por fatores pró-oxidantes, sendo capaz de reverter as alterações cerebrais possivelmente decorrentes da elevada oxidação, como foi observado por Abadie-Guedes et al. (2008; 2012). Estes autores demonstraram que a astaxantina (carotenoide com poderosa ação antioxidante) consegue reverter os efeitos do álcool, administrado de forma aguda e crônica, sobre a velocidade de propagação da DAC. O álcool administrado de forma aguda diminui a velocidade de propagação do fenômeno enquanto que a administração crônica eleva esta velocidade, a suplementação com astaxantina foi capaz de aumentar e diminuir, respectivamente, a velocidade da DAC nessas situações (ABADIE-GUEDES et al., 2008; 2012). Com base nesses trabalhos, acredita-se que a DAC seja um instrumento para o estudo dos efeitos de anti e pró-oxidantes sobre o cérebro (GUEDES et al., 2012).

Aydogan e colaboradores (2008) analisaram os efeitos de uma dose elevada de vitamina C sobre desreguladores endócrinos, e sugeriram que a vitamina em altas concentrações poderia atuar como pró-oxidante, devido a suas propriedades auto-oxidantes.

Com base nos trabalhos supracitados, o presente estudo se propôs a avaliar o efeito, sobre a DAC, da suplementação com doses crescentes de AA durante o período do desenvolvimento cerebral de ratos jovens. Nossa hipótese é de que a propagação da DAC, bem como os níveis cerebrais de malondialdeído consequentes à peroxidação lipídica, seriam afetados pelo ácido ascórbico de forma dose-dependente.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar os efeitos de doses crescentes de ácido ascórbico sobre o cérebro de ratos jovens nutridos e desnutridos, utilizando modelos eletrofisiológicos (DAC) e bioquímicos (níveis cerebrais de malondialdeído, como indicador de estresse oxidativo).

Específicos

- Correlacionar as diferentes doses de AA com as alterações de parâmetros da DAC (velocidade de propagação, amplitude e duração da sua variação lenta de voltagem);
- Analisar as diferenças eletrofisiológicas e bioquímicas entre os dois grupos nutricionais estudados (nutridos e desnutridos);
- Avaliar o grau de estresse oxidativo dos grupos experimentais, a partir de alterações dos níveis cerebrais de malondialdeído;
- Determinar se a possível correlação “dose-efeito” sobre a DAC e o estresse oxidativo é alterada no cérebro precocemente desnutrido.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES, R.; SANTOS, S.D.; CAHÚ, T.B.; GUEDES, R.C.A.; BEZERRA, R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. v. 32, 2008, p. 1417-1421.
- ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R.C.A.; BEZERRA, R.S. The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of two young-adult ages. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. v. 36, 2012, p. 1563-1567.
- ACCIOLY, N.E.; BENEVIDES, R.D.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.; GUEDES, R.C.A. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. v. 30, 2012, p. 405-10.
- ALMEIDA, S.S.; DUNTAS, L.H.; DYE, L.; NUNES M.L.; PRASAD C.; ROCHA, J.B.T.; WAINWRIGHT, P.; ZAIA, C.T.B.V.; GUEDES, R.C.A. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutritional Neuroscience*. v. 5, 2002, p. 311–320.
- ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex of the rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *Journal of Comparative Neurology*. v. 145, 1972, p. 465–514.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; PINHEIRO, P.C.F.; LIMA, D.S.C.; OZIAS, M.G.; OLIVEIRA, M.B.; GUIMARÃES, N.X.; GUEDES, R.C.A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experimental Neurology*. v. 200, 2006, p. 275-282.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.; GERMANO, P.C.; NEGRÃO, Y.D.; GUEDES, R.C. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *European Journal of Pharmacology*.v. 706, 2013, p. 70–75.

- AMARAL, A.P.B.; BARBOSA, M.S.S.; SOUZA, V.C.; RAMOS, I.L.T.; GUEDES, R.C.A. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. *Experimental Neurology*. v. 219, 2009, p. 492–498.
- AMBALI, S.F.; IDRIS, S.B.; ONUKAK, C.; SHITTU, M.; AYO, J.O. Ameliorative effects of vitamin C on short-term sensorimotor and cognitive changes induced by acute chlorpyrifos exposure in Wistar rats. *Toxicology and Industrial Health*. v. 26, 2010, p. 547-58.
- ANDRADE, A.F.; GUEDES, R.C.; TEODÓSIO, N.R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Brazilian journal of medical and biological research*. v. 23, 1990, p. 889-893.
- AYDOGAN, M.; KORKMAZ, A.; BARLAS, N.; KOLANKAYA, D. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*. v. 249, 2008, p. 35–39.
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A.A.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; GUEDES, R.C. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. *Experimental gerontology*. v. 47, 2012, p. 452-457.
- BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. Transição Nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 19, 2003, p. S181-S191.
- BORBA, J.M.C.; ROCHA-DE-MELO, A.P.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; SILVA, R.P.; PASSOS, P.P.; GUEDES, R.C.A. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. *Nutritional Neuroscience*. v. 13, 2010, p. 144-150.
- BRAUGHLER, J.M.; HALL, E.D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*. v. 6, 1989, p. 289-301.
- COSTA- CRUZ, R.R.G.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neuroscience Letters*. v. 303, n.3, 2001; p. 177-180
- COSTA-CRUZ, R.R.G.; SANTOS, A.A.; GUEDES, R.C.A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to

the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neuroscience Letters*. v. 401, 2006, p. 271-275.

DILIBERTO, E.J. JR.; ALLEN, P.L. Semidehydroascorbate as a product of the enzymic conversion of dopamine to norepinephrine. Coupling of semidehydroascorbate reductase to dopamine-beta-hydroxylase. *Molecular pharmacology*. v. 17, 1980, p. 421-426.

DONG, Y.; WANG, S.; ZHANG, T.; ZHAO, X.; LIU, X.; CAO, L.; CHI, Z. Ascorbic acid ameliorates seizures and brain damage in rats through inhibiting autophagy. *Brain Research*. v. 1535, 2013, p. 115-123.

EIKERMANN-HAERTER, K.; AYATA, C. Cortical Spreading Depression and Migraine. *Current. Neurology and Neuroscience Reports*. v. 10, 2010, p. 167-173 EL-BACHÁ, R.S.; LIMA-FILHO, J.L.; GUEDES, R.C.A. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. *Nutritional Neuroscience*. v. 1, 1998, p. 205-212.

ELDRIDGE, C.F.; BUNGE, M.B.; BUNGE, R.P.; WOOD, P.M. Differentiation of axon related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. *The Journal of cell biology*. v. 105, 1987, p. 1023-1034.

FARIAS-SANTOS, R.C.; LIRA, M.C.A.; PEREIRA, D.E.S.; SÁ, I.R.; PIMENTEL, M.R.F.; ARAÚJO, L.L.; GUEDES, R.C.A. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. *Neuroscience Letters*. v. 454, 2009, p. 218-222.

FREGNI, F.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; FREEDMAN, S.; PASCUAL-LEONE, A.; GUEDES, R.C.A. Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation. *European Journal of Neuroscience*. v. 21, 2005, p. 2278-2284.

FREGNI, F.; LIEBETANZ, D.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; NITSCHKE, M.A.; PASCUAL-LEONE, A.; GUEDES, R.C.A. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Experimental Neurology*. v. 204, 2007, p. 462-466.

- FREITAS, R.M. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. *Neuroscience Letters*. v. 462, 2009, p. 225–229.
- GRANTHAM-MCGREGOR, S. A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *The Journal of nutrition*. v. 125, 1995, p. 2233S-2238S.
- GUEDES, R.C.A.; DO-CARMO, R.J. Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Experimental Brain Research*. v. 39, 1980, p. 341-349
- 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 20, 1987, p. 639–642.
- GUEDES, R.C.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M.C.; SILVA, A.T.; TEODÓSIO, N.R. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 22, 1989, p. 923-925.
- GUEDES, R.C.A.; BARRETO, J. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 25, 1992, p. 393-397.
- GUEDES, R.C.A.; CABRAL-FILHO, J.E.; TEODÓSIO, N.R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and malnourished rats. In: Do-Carmo, R.J. (Editor), *Spreading Depression*. Experimental Brain Research Series. v. 23, 1992, p. 17-26
- GUEDES, R.C.A.; FRADE, S.F. Effect of Ethanol on cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 26, 1993, p. 1241-1244.
- GUEDES, R.C.; PEREIRA-DA-SILVA, M.S. Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 26, 1993, p. 1123-1128.
- GUEDES, R. C. A.; SANTOS-MONTEIRO, J.; TEODÓSIO, N. R. Malnutrition and brain function: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. *Revista Brasileira de Biologia*. v. 56, 1996a, p. 293-301
- GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; TEODÓSIO, N.R. Effect of aging on cortical spreading depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 29, 1996b, p. 1407-1412

- GUEDES, R.C.A.; CAVALHEIRO, E.A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy research*. v. 27, 1997, p. 33-40.
- GUEDES, R.C.A.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; COSTA-CRUZ, R.R.G. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*. v. 5, n. 2, 2002, p. 115-123
- GUEDES, R.C.A. Electrophysiological Methods: Application in Nutritional Neuroscience. In: Liebermann, H.; Kanarek, R.; Prasad, C. (Eds.), *Nutritional Neurosciences: Overview of an emerging field*. CRC Press, New York. Nutrition, Brain and Behavior Series, v. 3, chapter 4, 2005, p. 39-54.
- GUEDES, R.C.A.; VASCONCELOS, C.A.C. Sleep deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. *Neuroscience Letters*. v. 442, 2008, p. 118-122.
- GUEDES, R.C.A.; VASCONCELOS, C.A.C. Sleep deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. *Neuroscience Letters*. v. 442, 2008, p. 118-122.
- GUEDES, R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Preedy, V.R.; Watson, R.R.; Martin, C.R. (Eds.), Springer. 2011, p. 2343-2355
- GUEDES, R.C.A.; ABADIE-GUEDES, R.; BEZERRA, R.S. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. *Nutritional Neuroscience*. v. 15, 2012, p. 111-119.
- GUEDES, R.C.A.; ROCHA-DE-MELO, A.P.; LIMA, K.R.; ALBUQUERQUE, J.M.S.; FRANCISCO, E.S. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. *Nutritional Neuroscience*. v. 16, 2013, p. 142-146.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free radical research*. v. 25, 1996, p. 439-454.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring RS and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*. v. 142, 2004, p. 231-255.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*. v. 97, 2006, p. 1634-1658.

- HARRISON, F.E.; MAY, J.M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free radical biology & medicine*. v. 46, 2009, p. 719-730.
- HORNIG, D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 258, 1975, p. 103–117.
- JACKSON, T.S.; XU, A.M.; VITA, J.A. JR.; KEANEY, J.F. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circulation research*. v. 83, 1998, p. 916–922.
- KOROLEVA, V.I.; BURES, J. Blockade of cortical spreading depression in electrically and chemically stimulated areas of cerebral cortex in rats. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. v. 48, 1980, p. 1-15. KUO, C.H.; HATA, F.; YOSHIDA, H.; YAMATODANI, A.; WADA, H. Effect of ascorbic acid on release of acetylcholine from synaptic vesicles prepared from different species of animals and release of noradrenaline from synaptic vesicles of rat brain. *Life Sciences*. v. 24, 1979, p. 911–915.
- LAURITZEN, M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*. v.117, 1994, p. 199–210.
- LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. v. 7, 1944, p. 359-390
- LEÃO, A.A.P. Further observations on the spreading depression of activity in cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. v. 10, 1947, p. 409-414
- LEÃO, A.A.P. In: *Experimental Models of Epilepsy - A Manual for the Laboratory Worker*. D.P. Purpura et al. (eds.), Raven Press, New York, Spreading depression. 1972, p. 173-196.
- LEHMANKÜHLER, A.; RICHTER, F. Spreading depression in upper and lower depths of the rat cerebral cortex and its possible implications on the type of human migraine. . In *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment*. (LEHMANKÜHLER, A.; GROTEMEYER, K.-H.; TEGTMEIER, F. eds.) 1993, p. 267–278.
- LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *The New England journal of medicine*. v. 31, 1986, p. 892-902.
- LEVITSKY, D.A.; STRUPP, B.J. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *The Journal of nutrition*. v. 125, 1995, p. 2212S-2220S.
- LIMA, D.S.C.; MAIA, L.M.S.S.; BARBOZA, E.A.; DUARTE, R.A.; SOUZA, L.S.; GUEDES, R.C.A. L-glutamine supplementation during the lactation period

facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. *Life Sciences*. v. 85, 2009, p. 241-247.

- LIMA, C.B.; SOARES, G.S.; VITOR, S.M.; CASTELLANO, B.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.; GUEDES, R.C.A. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. *Life Sciences*. v. 93, 2013, p. 388-392.
- MAIA, L.M.S.S.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; DUDA-DE-OLIVEIRA, D.; ANGELIM, M.K.C.; GERMANO, P.C.P.; SANTOS, S.F.; GUEDES, R.C.A. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. *Nutritional Neuroscience*. v. 12, 2009, p. 73-80.
- MEREDITH, M.E.; HARRISON, F.E.; MAY, J.M. Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. *Biochemical and biophysical research communications*. v. 414, 2011, p. 737-742.
- MERKLER, D.; KLINKER, F.; JÜRGENS, T.; GLASER, R.; PAULUS, W.; BRINKMANN, B.G.; SEREDA, M.; GUEDES, R.C.A.; BRÜCK, W.; LIEBETANZ, D. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Annals of Neurology*. v. 66, 2009; p. 355–65.
- MONTE-GUEDES, C.K.; ALVES, E.V.; VIANA-DA-SILVA, E.; GUEDES, R.C.A. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. *Neuroscience Letters*. v. 496, 2011, p. 191-194.
- MONTE-SILVA, K.K.; ASSIS, F.L.N.; LEAL, G.M.A.; GUEDES, R.C.A. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. *Nutritional Neuroscience*. v. 10, 2007, p. 187–194.
- MONTINE, T.; NEELY, M.; QUINN, J.; BEAL, M.; MARKESBERY, W.; ROBERTS, L.; MORROW, J. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine*. v. 33, 2002, p. 620–626.
- MORGANE, P.J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developping nervous system in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. v. 2, 1978; p. 137–230

- MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. v. 17, 1993, p. 91–128.
- MORI, A.; HIRAMATSU, M.; YOKOI, I.; EDAMATSU, R. Biochemical pathogenesis of posttraumatic epilepsy. *The Pavlovian journal of biological science*. v. 25, 1990, p. 54–62.
- MURASHIMA, Y.L.; KASAMO, K.; SUZUKI, J. Antiepileptic effects of allopurinol on EL mice associated with changes in SOD isoenzyme activities. *Epilepsy research*. v. 32, 1998, p. 254–265.
- NAIDU, K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition journal*. v. 2, 2003, p. 7, doi:10.1186/1475-2891-2-7.
- NIKI, E.; NOGUCHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *The American journal of clinical nutrition*. v. 62, 1995, p. 1322S–1326S.
- PAIXÃO, A.D.O.; TRINDADE, A.S.; DANTAS, A.C.; BARRETO, I.S.S.; VIEIRA-FILHO, L.D.; MEDEIROS, M.C.; TEODÓSIO, N.R.; GUEDES, R.C.A. Impact of two early malnutrition models on renal and neural functions in rats. In: Vesler LW (Ed) *Malnutrition in the 21st Century* [ISBN 978-1-60021-788-3] Nova Science Publishers, Inc., N.York, Chapter. v. 13, 2007, p. 239-263.
- PARLE, M.; DHINGRA, D. Ascorbic acid: a promising memory-enhancer in mice. *Journal of pharmacological sciences*. v. 93, 2003, p. 129–135.
- PRATICO, D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochemical pharmacology*. v. 63, 2002, p. 563–567.
- REBEC, G.V.; PIERCE, R.C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Progress in neurobiology*. v. 43, 1994, p. 537-565.
- REBEC, G.V.; BARTON, S.J.; MARSEILLES, A.M.; COLLINS, K. Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport* v. 14, 2003, p. 1263–1265.
- RICE, M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends in neurosciences*. v. 23, 2000, p. 209-216.
- ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the

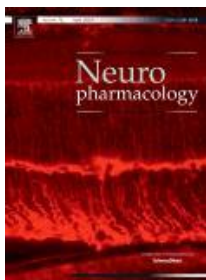
lactation period. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 30, 1997, p. 663–669

- ROCHA-DE-MELO, A.P.; CAVALCANTI, J.B.; BARROS, A.S.; GUEDES, R.C.A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutritional neuroscience*. v. 9, 2006, p. 155-160
- ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.X.; REITER, R.J.; VALDIVIA-VELAZQUEZ, M.; MARTINEZ-BARBOZA, G.; ACOSTA-MARTINEZ, J.P.; ORTIZ, G.G. Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *Journal of pineal research*. v. 35, 2003, p. 80–84.
- SANTOS-MONTEIRO, J.S.; TEODÓSIO, N.R.T.; GUEDES, R.C.A. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*. v. 3, 2000, p. 29-40.
- SCHWEITZER, N.B.; ALESSIO, H.M.; BERRY, S.D.; ROESKE, K.; HAGERMAN, A.E. Exercise-induced changes in cardiac gene expression and its relation to spatial maze performance. *Neurochemistry International*. v. 48, 2006, p. 9–16
- SEREGI, A.; SCHAEFER, A.; KOMLÓS, M. Protective role of brain ascorbic acid content against lipid peroxidation. *Experientia*. v.34, 1978, p. 1056–1057.
- SHAHIDI, S.; KOMAKI, A.; MAHMOODI, M.; ATRVASH, N.; GHODRATI, M. Ascorbic acid supplementation could affect passive avoidance learning and memory in rat. *Brain research bulletin*. v. 76, 2008, p. 109–113.
- SIES H. Oxidative stress II. Oxidants and Anti-oxidants. Academic Press 1991, London.
- SIMEONE, K.A.; MATTHEWS, S.A.; SAMSON, K.K.; SIMEONE, T.A. Targeting deficiencies in mitochondrial respiratory complex I and functional uncoupling exerts anti-seizure effects in a genetic model of temporal lobe epilepsy and in a model of acute temporal lobe seizures. *Experimental neurology*. v. 251, 2014, p. 84-90.
- SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Research*. v. 28, 1971, p. 85-95

- SOMJEN, G.G. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological Reviews*. v. 81, n. 3, 2001, p. 1065–1096.
- SONG, J.H.; SHIN, S.H.; ROSS, G.M. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Research*. v. 895, 2001, p. 66–72.
- SOUZA, T.K.; SILVA, M.B.; GOMES, A.R.; OLIVEIRA, H.M.; MORAES, R.B.; FREITAS-BARBOSA, C.T.; GUEDES, R.C.A. Potentiation of spontaneous and evoked cortical electrical activity after spreading depression: in vivo analysis in well-nourished and malnourished rats. *Experimental brain research*. v. 214, 2011, p. 463-469.
- TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, A.S.; GUEDES, R.C. A Regional Basic Diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. v. 40, 1990, p. 533-47.
- TENORIO, A.S.; OLIVEIRA, I.D.V.A.; GUEDES, R.C.A. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. v. 27, 2009, p. 431–437
- TOMÉ, A.R.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Neuronal damage and memory deficits after seizures are reversed by ascorbic acid? *Arquivos de neuro-psiquiatria*. v. 68, 2010, p. 579-85.
- TRINDADE-FILHO, E.M.; VASCONCELOS, C.A.C.; GUEDES, R.C.A. Tryptophan administration acutely impairs cortical spreading depression propagation in REM-sleep-deprived and non-deprived adult rats. *Psychology & Neuroscience*. v. 2, 2009, p. 235-241.
- VASCONCELOS, C.A.C.; OLIVEIRA, J.A.F.; COSTA, L.A.O.; GUEDES, R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. *Nutritional neuroscience*. v. 7, 2004, p. 163-170.
- VIEIRA-FILHO, L.D.; LARA, L.S.; SILVA, P.A.; LUZARDO, R.; EINICKER-LAMAS, M.; CARDOSO, H.D.; PAIXÃO, H.D.; VIEYRA, A. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. v. 36, 2009, p. 1157-1163.

- WAGNER, G.C.; CARELLI, R.M.; JARVIS, M.F. Ascorbic acid reduces the dopamine depletion induced by methamphetamine and the 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion. *Neuropharmacology*. v. 25, 1986, p. 559–561.
- XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R.C.A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. *Brazilian journal of medical and biological research*. v. 24, 1991; p. 1277-1281.
- XUE, Y.; XIE, N.; CAO, L.; ZHAO, X.; JIANG, H.; CHI, Z. Diazoxide preconditioning against seizure-induced oxidative injury is via the PI3K/Akt pathway in epileptic rat. *Neuroscience Letters*. v. 495, 2011, p. 130–134.
- ZALANI, S.; RAJALAKSHMI, R.; PAREKH, L.J. Ascorbic acid concentration of human fetal tissues in relation to fetal size and gestational age. *The British journal of nutrition*. v. 61, 1989, p. 601–606.

ARTIGO PUBLICADO



TITLE: Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis

Neuropharmacology (2014), pp. 155-160.

DOI information: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.027

Authors: Rosângela Figueiredo **Mendes-da-Silva**¹, Andréia Albuquerque Cunha **Lopes**¹, Maria Eduarda **Bandim-da-Silva**¹, Gabriela de Araujo **Cavalcanti**¹, Ana Rafaela Oliveira **Rodrigues**¹, Belmira Lara da Silveira **Andrade-da-Costa**², Rubem Carlos Araújo **Guedes**^{1*}

Affiliation: ¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil

***Corresponding author:** Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Phone: +55-81-21268936

Fax: +55-81-21268473

e-mail: guedes.rca@gmail.com

second e-mail: rguedes@ufpe.br

Abbreviations: AA, ascorbic acid; CSD, cortical spreading depression; sal, saline; DC, direct current; MDA, malondialdehyde; BCA, bichinchoninic acid

Abstract

Although ascorbic acid (AA) is an antioxidant, under certain conditions it can facilitate oxidation, which may underlie the opposite actions of AA on brain excitability in distinct seizure models. Here, we investigated whether chronic AA administration during brain development alters cortical excitability as a function of AA dose, as indexed by cortical spreading depression (CSD) and by the levels of lipid peroxidation-induced malondialdehyde. Well-nourished and early-malnourished rats received per gavage 30, 60, or 120 mg/kg/d of AA, saline, or no gavage treatment (naïve group) at postnatal days 7-28. CSD propagation and malondialdehyde levels were analyzed at 30-40 days. Confirming previous observations, CSD velocities were significantly higher in the early-malnourished groups than in the well-nourished groups. AA dose was important: 30 mg/kg/d AA decelerated CSD and reduced malondialdehyde levels, whereas 60 mg/kg/d and 120 mg/kg/d accelerated CSD and augmented malondialdehyde levels compared with the corresponding saline and naïve groups. Malondialdehyde levels were lower in the CSD hemisphere of the early-malnourished 120 mg/kg/d group than in the corresponding well-nourished group. In the naïve, early-malnourished, no AA group, CSD hemispheres harbored lower malondialdehyde levels than control hemispheres. Our findings suggest that AA acts as an antioxidant in the brain when administered at low doses, but as a prooxidant at high doses, as indicated by CSD and malondialdehyde levels.

Key words: antioxidant molecules, ascorbic acid, cortical spreading depression, prooxidant molecules, malnutrition, brain development.

1. Introduction

The mechanisms of excitability-related brain disturbances include active free radicals of oxygen (Braugher and Hall, 1989; Mori et al., 1990), which is certainly the basis for the growing use of antioxidants to protect the brain against excitability-induced damage (Murashima et al., 1998; Simeone et al., 2014). Ascorbic acid (AA) is one of the most studied antioxidants; it is highly concentrated in the adrenal gland and central nervous system (Miura et al., 2009), with postulated important action during brain development (Zalani et al., 1989). The physiological actions of AA include protection against oxidative stress, with possible protective actions in neurodegenerative diseases (Halliwell, 2006; Padayatty et al., 2003).

Regarding excitability-dependent brain phenomena, experimental evidence indicates that AA can exert biphasic modulating action (Oliveira et al., 2004). For example, the administration of 60 mg/kg/d of AA to rats increased the oxidative stress in the brain induced by bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol (Aydogan et al., 2008), suggesting a prooxidant action of AA. Previously, our group demonstrated a similar prooxidant effect in weaned rats treated with 60 mg/kg/d of AA for three weeks (from postnatal days 7 to 28); compared with saline-treated controls, AA-exposed animals displayed significantly higher-velocity propagation of the brain excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) (Monte-Guedes et al., 2011).

CSD was first described as a reduction in the spontaneous electrical activity of the cerebral cortex in response to the mechanical, electrical, or chemical stimulation of one point on the cortical surface (Leão, 1944). The phenomenon is characterized by neuronal depolarization (Dreier, 2011), and has been electrophysiologically demonstrated in the brains of many vertebrate species (Bures et al., 1974) as well as in the human brain (Fabricius et al., 2008; Gorji and Speckmann, 2004). CSD is modulated by changes in brain excitability (Koroleva and Bures, 1980), and is influenced by the production of reactive oxygen species in

brain tissue (El-Bachá et al., 1998). Related to neuronal excitability, CSD has been associated with relevant neurological diseases such as migraine (Bhaskar et al., 2013; Rogawski, 2008), brain ischemia (Busija et al., 2008), and epilepsy (Costa-Cruz et al., 2006; Guedes and Cavalheiro, 1997). Different CSD velocities of propagation along the cortical tissue, which indicate different brain susceptibilities to CSD, are associated with the manipulation of pharmacological, environmental, and nutritional conditions (see Guedes, 2011 for a review).

Malnutrition can disrupt the electrophysiological organization of the nervous system both in laboratory animals (Chen et al., 1997; Morgane et al., 1978) and in humans (Grantham-McGregor, 1995; Levitsky and Strupp, 1995). We previously demonstrated that early malnutrition increases CSD propagation (Rocha-de-Melo et al., 2006), but no information is available regarding the interaction between malnutrition and AA effects on CSD.

In the present work, we addressed two questions via electrophysiological recording of CSD in the brains of weaned young rats subjected to malnutrition during lactation. First, how does the administration of different doses of AA during brain development affect CSD propagation? Second, how is this effect influenced by malnutrition early in life? We demonstrated CSD deceleration and acceleration following the administration of low and high doses of AA, respectively.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Wistar rat pups (n=96) born from distinct dams were randomly distributed at birth to form litters with eight pups per nurse and assigned to two nutritional groups according to the mother's dietary conditions. The well-nourished group (n=53) was suckled by dams fed a commercial laboratory chow diet (Purina do Brazil LTDA) containing 23% protein. The

malnourished group (n=43) was suckled by dams fed a regional basic diet containing 8% protein. This diet mimics the diet of low-income human populations of Northeastern Brazil (Teodósio et al., 1990). After weaning at post-natal day 21, the pups were fed the chow diet.

Both nutritional groups were subdivided into five groups denominated according with the treatment they received, from postnatal days 7-28, per gavage: the saline group (Sal; n=9 Well-nourished rats and 9 Malnourished rats) received saline via gavage. For the AA-treated groups, rats received 30 mg/kg/d (AA-30; n=15 Well-nourished rats and 9 Malnourished rats), 60 mg/kg/d (AA-60; n=6 Well-nourished rats and 6 Malnourished rats), or 120 mg/kg/d (AA-120; n=12 Well-nourished rats and 9 Malnourished rats). AA was purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. A fifth “naïve” group (n=11 Well-nourished rats and 10 Malnourished rats) received no gavage.

Animals were reared in polypropylene cages (51 cm x 35.5 cm x 18.5 cm) in a room maintained at 22 ± 1 °C with a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00 AM) with free access to food and water. They were weighed at postnatal days 7, 14, 21, and 28. All experiments were carried out at the Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) in accordance with the guidelines of the Institutional Ethics Committee for Animal Research (approval protocol no. 23076.013959/2012-79), which comply with the “Principles of Laboratory Animal Care” from the National Institutes of Health of the United States. All efforts were made to minimize animal suffering, and to reduce the number of animals used.

2.2 Recording of CSD

At 30-40 postnatal days, the animals were subjected to a 4-h CSD recording session, as previously described (Lima et al., 2013). Briefly, under anesthesia (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, i.p.; both purchased from Sigma, St. Louis, Mo, USA) three trephine holes (2-3 mm in diameter) were made on the right side of the skull, parallel to the midline. The

first hole (on the frontal bone) was used to apply the stimulus to elicit CSD. The other two holes (on the parietal bone) were used to record the propagating CSD wave. Rectal temperature was continuously monitored and maintained at 37 ± 1 °C by a heating blanket. During the recording session, CSD was elicited at 20-min intervals by applying, for 1 min, 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. The direct current (DC)-potential change typical of CSD was recorded at the two parietal points on the cortical surface with a pair of Ag-AgCl agar-Ringer electrodes that were connected to a digital data acquisition system (EMG Systems, São Paulo, Brazil). A common reference electrode of the same type was placed on the nasal bones. For all CSD episodes, we calculated the amplitude and duration of the negative slow potential shifts of the CSD waves, as previously reported (Lima et al., 2013). The velocity of CSD propagation was calculated based on the time required for a CSD wave to cross the distance between the two recording electrodes. In the measurement of CSD velocities, the initial point of each DC negative rising phase was used as the reference point.

In each CSD recording session, three or four animals per group were recorded simultaneously. After finishing the recording session, the still-anesthetized animals were decapitated. The brains were removed rapidly and carefully, rinsed in ice-cold saline, and dried on filter paper. The left and right cerebral cortices were separated, weighed, and pooled. The pooled cortical tissue of each separated hemisphere was homogenized in a 0.9% (w/v) NaCl solution (1:10) at 4 °C, centrifuged for 10 min at $1000 \times g$ at 4 °C, and the supernatants were stored at -80 °C for the analysis of lipid peroxidation, as recently reported in another publication from our group (Cardoso et al., 2012).

2.3 Analysis of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde (MDA) levels using a thiobarbituric acid-reactive substances-based method (Ohkawa et al., 1979). The MDA levels were determined in 36 well-nourished rats (Sal, n=7; naïve, n=6; AA-30, n=10; AA-60, n=5; AA-120, n=8) and 39 malnourished rats (Sal, n=8; naïve, n=11; AA-30, n=8; AA-60, n=6; AA-120, n=6). The reaction was developed by sequential addition of 40 µL of 8.1% sodium dodecyl sulfate, 300 µL of 20% acetic acid (pH 3.5), and 300 µL of 0.8% thiobarbituric acid solutions to the 100-µL homogenate aliquot in a boiling water bath for 30 min. Experiments were carried out in triplicate. After cooling the tubes with tap water, 300 µL of n-butanol were added to the sample. The tubes were centrifuged at 2500 x *g* for 10 min, and the organic phase was read at 532 nm using a plate reader. Total protein concentrations were determined with the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

2.4 Statistical analysis

Intergroup differences were compared using two-way analysis of variance (ANOVA) including nutritional status (well-nourished and malnourished) and treatment (saline, naïve, AA-30, AA-60, and AA-120) as factors. ANOVA was followed by a Holm-Sidak post-hoc test when indicated. MDA levels in the two hemispheres of the same animal were compared via paired Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Body weight

The body weights of the five well-nourished groups and five malnourished groups are presented in Figure 1. During days 7-28, all malnourished groups had lower body weights

than the corresponding well-nourished groups ($p < 0.05$). No weight difference associated with AA treatment was observed.

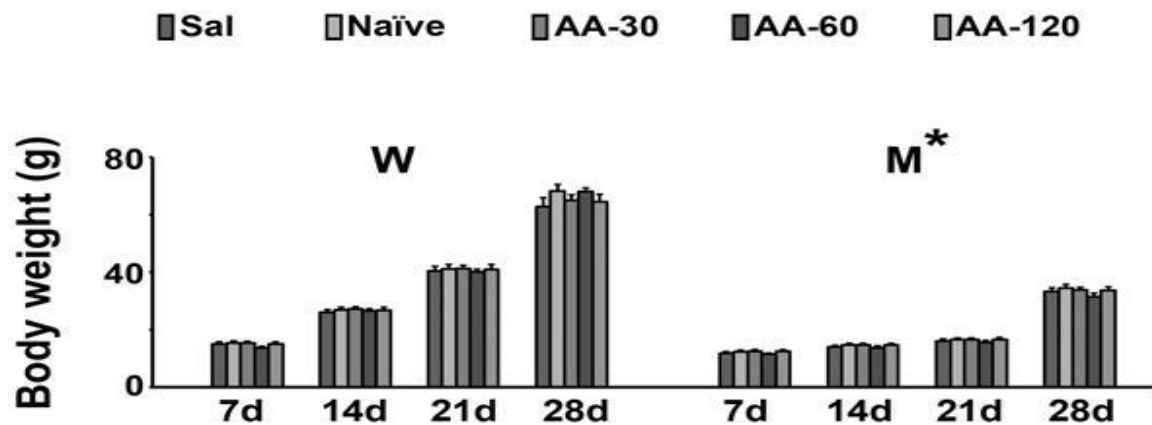


Fig. 1

Body weights of well-nourished and malnourished rats on postnatal days 7, 14, 21, and 28. Mean $\pm$ standard error of the mean is presented. Animals were subdivided into five groups, as defined in the main text: naïve, saline (Sal), 30 mg/kg/d AA (AA-30), 60 mg/kg/d AA (AA-60), and 120 mg /kg/d AA (AA-120). All malnourished groups differed significantly from the corresponding well-nourished groups ($p < 0.05$; ANOVA plus the Holm-Sidak test). AA treatment did not influence body weight.

3.2 CSD recording

Figure 2 contains typical electrophysiological CSD recordings (slow DC potential change) of five well-nourished and five malnourished rats that were representative of the five treatment groups. Under normal conditions (Sal and naïve groups in Fig. 2), 1-min stimulation with 2% KCl at one point of the right frontal cortex elicited a single CSD wave that propagated without interruption and was recorded by the two electrodes located more posterior on the surface of the parietal cortex (Fig. 2). Recording of the slow potential change confirmed the presence of CSD after KCl application. The electroencephalographic changes caused by CSD always recovered after a few minutes (Fig. 2), and we maintained a 20-min interval between subsequent KCl stimulations. In the majority of AA-120 animals (58.3% and 90% of the well-nourished and malnourished rats, respectively), a single KCl stimulation elicited two CSD episodes (Fig. 2), which may be indicative of increased cortical sensibility due to the AA-120 treatment.

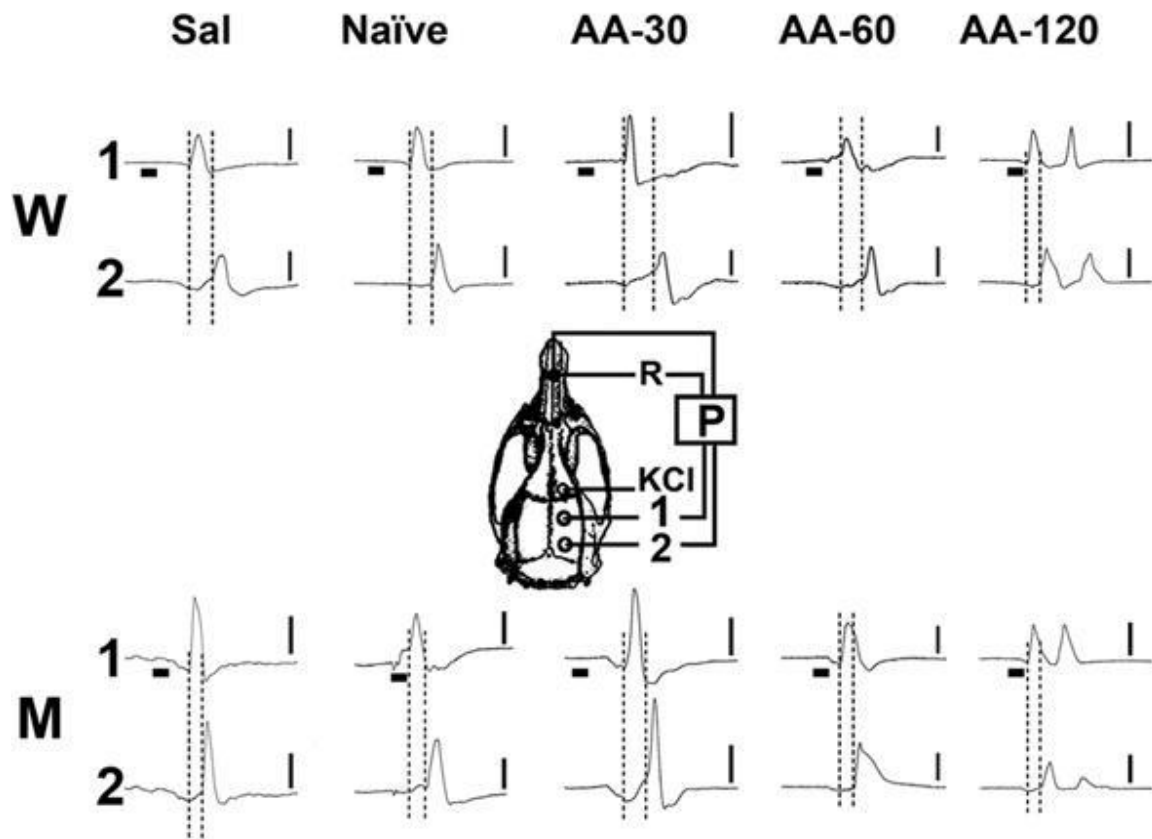


Fig. 2.

Electrophysiological recordings (slow potential changes, P) of CSD in five well-nourished and five malnourished rats representative of the five treatment groups defined in the main text and in Figure 1. The vertical solid bars indicate 10 mV for P (negative upwards). The horizontal bars indicate the time (1 min) of stimulation with 2% KCl to elicit CSD. Once elicited in the frontal cortex, CSD was recorded by the two cortical electrodes located at the parietal cortex (central skull diagram, points 1 and 2). A third electrode of the same type was placed on the nasal bones and served as a common reference (R) for the recording electrodes. The vertical dashed lines indicate the latency of a CSD wave crossing the interelectrode distance. This latency was shorter in the malnourished groups than in the well-nourished groups, except for the AA-120 condition. When compared with the control groups in the same nutritional condition, latencies in the AA groups were longer for the lowest AA dose (AA-30) and shorter for the other two AA doses (AA-60>AA-120).

3.3 CSD parameters

ANOVA showed a significant main effect of nutritional status on the CSD velocity of propagation ($F[1,94] = 89.46$; $p < 0.001$). Post-hoc comparisons showed that the velocities were higher in the malnourished naïve, saline, AA-30, and AA-60 animals compared with the corresponding well-nourished animals ($p < 0.001$). Well-nourished and malnourished rats treated with the highest AA dose (120 mg/kg/d) presented with the highest CSD velocities (5.26 ± 0.46 and 5.15 ± 0.33 mm/min, respectively). In both well-nourished and malnourished

condition, the lower AA dose (30 mg/kg/d) decelerated CSD compared with the corresponding saline and naïve groups, whereas the higher doses (60 mg/kg/d and 120 mg/kg/d) accelerated CSD (Fig. 3).

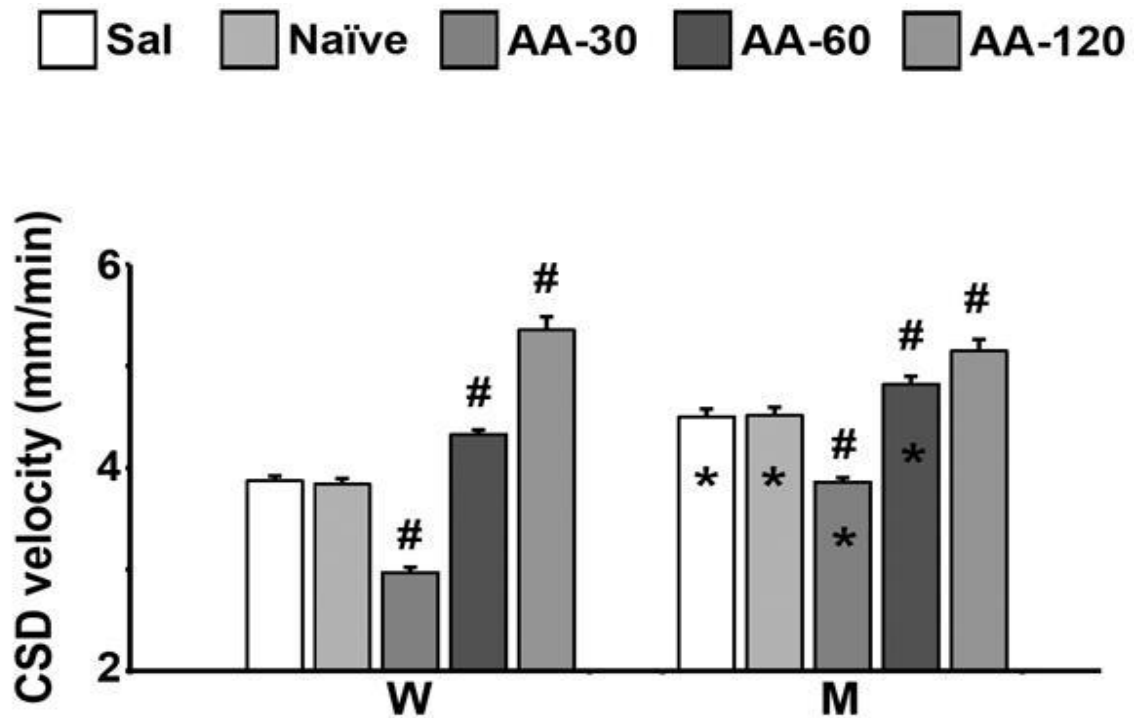


Fig. 3

CSD velocity of propagation in 30-40-day-old rats previously suckled by well-nourished or malnourished dams. Treatments are as defined in Figure 1 and the main text. Values are presented as mean±standard error of the mean. * $p < 0.05$ compared with the corresponding well-nourished values. # $p < 0.05$ compared with the control groups (saline and naïve) under the same nutritional conditions (ANOVA plus the Holm-Sidak test).

The amplitude and duration of the negative slow potential shift, which is the hallmark of CSD, are shown in Table 1. The mean amplitude varied from 9.5 ± 4.6 mV to 12.7 ± 3.4 mV in the well-nourished groups, and from 13.9 ± 2.5 mV to 15.6 ± 4.2 mV in the malnourished groups (Table 1). ANOVA revealed a significant main effect of nutritional status on the amplitude ($F[1,95] = 17.79$; $p < 0.001$). Post-hoc comparisons showed that the amplitudes were higher in the malnourished naïve and AA-30 animals compared with the corresponding well-nourished rats ($p < 0.001$).

The mean duration of the negative slow potential shift ranged from 81.5 ± 8.0 s to 84.3 ± 8.9 s in the well-nourished groups, and from 73.7 ± 3.7 s to 82.5 ± 7.4 s in the

malnourished groups (Table 1). ANOVA revealed a significant main effect of nutritional status on the duration ($F[1,95] = 9.83$; $p < 0.001$). Post-hoc comparisons showed that the duration was higher in the malnourished naïve and AA-120 rats compared with the corresponding well-nourished animals ($p < 0.001$).

Table 1

Amplitude and duration of the negative slow potential shifts of CSD in well-nourished and malnourished rats treated per gavage with three doses of AA. The AA groups were compared to the control groups treated with saline or no treatment (naïve). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. ^a $p < 0.05$ compared with the corresponding well-nourished group (ANOVA plus the Holm-Sidak test).

Treatment groups	CSD Amplitude (mV)		CSD Duration (s)	
	Well-nourished	Malnourished	Well-nourished	Malnourished
Saline	12.0 $\pm$ 4.7 (n=9)	14.6 $\pm$ 4.2 (n=9)	84.3 $\pm$ 8.9 (n=9)	77.6 $\pm$ 5.1 (n=9)
Naïve	10.7 $\pm$ 2.6 (n=11)	15.5 $\pm$ 2.9 ^a (n=10)	83.7 $\pm$ 8.6 (n=11)	75.9 $\pm$ 6.2 ^a (n=10)
AA-30	9.5 $\pm$ 4.6 (n=15)	15.6 $\pm$ 4.2 ^a (n=9)	82.9 $\pm$ 8.5 (n=15)	81.6 $\pm$ 5.1 (n=9)
AA-60	12.7 $\pm$ 3.4 (n=6)	13.9 $\pm$ 2.5 (n=6)	83.0 $\pm$ 7.8 (n=6)	82.5 $\pm$ 7.4 (n=6)
AA-120	11.9 $\pm$ 3.7 (n=12)	14.3 $\pm$ 3.6 (n=9)	81.5 $\pm$ 8.0 (n=12)	73.7 $\pm$ 3.7 ^a (n=9)

3.4 Cortical levels of MDA

Table 2 contains measurements of the MDA levels in the cerebral cortices of well-nourished and malnourished animals. ANOVA revealed a significant main effect of treatment on the MDA levels ($F[4,85] = 12.53$; $p < 0.001$). Post-hoc comparisons showed that in the well-nourished condition the MDA levels were lower in the AA-30 rats compared with the naïve, AA-60 and AA-120 animals ($p < 0.001$). In the malnourished condition, the MDA levels were lower in the AA-30 animals compared with the naïve, saline and AA-60 rats ($p < 0.001$).

Table 2

MDA levels (nmol/mg) in the cerebral cortex of 30-40-day-old well-nourished and malnourished rats previously treated (per gavage) from postnatal day 7 to 28 with 30 mg/kg/d or 60 mg/kg/d, or 120 mg/kg/d ascorbic acid (AA). Data are expressed as mean±standard deviation. Values marked with lower case letters differ significantly ($P<0.05$) from the corresponding values of the groups marked with the same upper case letters in the left column (ANOVA plus Holm-Sidak test). ANOVA indicated that there is not a statistically significant interaction between the nutritional status and the treatments ($F_{4,85}=1.028$; $P=0.399$).

Treatment groups	Well-nourished	Malnourished
Saline^A	2.13±0.30 (n=7)	2.26±0.58 (n=8)
Naïve^B	2.36±0.54 (n=6)	2.25±0.38 (n=11)
AA-30^C	1.62±0.31 ^{bde} (n=10)	1.56±0.37 ^{abd} (n=8)
AA-60^D	2.86±0.39 (n=5)	2.45±0.69 (n=6)
AA-120^E	2.83±0.69 ^a (n=8)	2.32±0.30 (n=6)

4. Discussion

The present results extend our first observations of the CSD-related effects of chronic systemic application of 60 mg/kg/d of AA on the developing rat brain (Monte-Guedes et al., 2011). Previously, we showed that AA accelerated CSD at that dose, which is compatible with a prooxidant effect; other studies also postulated a prooxidant effect at the same AA dose (Aydogan et al., 2008). In the present investigation, we used electrophysiology in rats to identify both antioxidant (CSD deceleration) and prooxidant (CSD acceleration) actions following low (30 mg/kg/d) and high (120 mg/kg/d) doses of AA, respectively (Fig. 3). We believe that early and chronic AA administration causes developmental changes in the brain that are associated with the modulation of CSD propagation. Such an effect cannot be attributed to the stress associated with the gavage procedure, because the saline-treated groups

were equally submitted to gavage and presented with CSD features similar to those of the naïve controls (Fig. 3).

Increasing the production of reactive oxygen species can result in the elicitation of CSD *in vitro* (Netto and Martins-Ferreira, 1989) and *in vivo* (El-Bachá et al., 1998), and antioxidants such as the carotenoid astaxanthin impair the chronic ethanol facilitating effect on CSD propagation that is thought to be due to the formation of reactive oxygen species (Abadie-Guedes et al., 2008). In contrast to this evidence, our previous study revealed a facilitating effect of 60 mg/kg/d AA on CSD propagation, and we postulated that such action would depend on the dose of AA employed. Under certain conditions, AA has been suggested to exert biphasic modulating action on excitability-dependent brain phenomena (Aydogan et al., 2008; Oliveira et al., 2004). The present data support our hypothesis, as a lower dose of AA (30 mg/kg/d) impaired CSD propagation, whereas 120 mg/kg/d, a dose higher than that used in previous studies, accelerated CSD (Fig. 3). Interestingly, there is *in vitro* (Hisanaga et al., 1992; Song et al., 2001) as well as *in vivo* (Aydogan et al., 2008) evidence suggesting that AA can exert prooxidant action, leading to neurotoxicity. Furthermore, AA can act as both an anticonvulsant and a proconvulsant in the rat brain (Ayyildiz et al., 2007; Oliveira et al., 2004), and in the presence of transition-metal ions AA can produce reactive radical species in the brain (Halliwell, 1992).

MDA is the final product of lipid peroxidation, generating free radicals and increasing oxidative stress, which can be counteracted by antioxidant molecules (Mehla et al., 2010). In this study, MDA levels were measured via the thiobarbituric acid reactive substances-based method; opposite changes in MDA levels were observed at lower (30 mg/kg/d) and higher (120 mg/kg/d) AA doses compared with the levels in the controls (Table 2). Increased MDA levels in the well-nourished AA-120 group suggest that this dose may have raised the oxidative stress, while the well-nourished AA-30 treatment reduced it, as reflected by

decreased MDA levels. These findings are in agreement with the dichotomous CSD results for the AA-30 (CSD deceleration) and AA-120 groups (CSD acceleration), suggesting antioxidant and prooxidant action of AA, respectively. It is important to emphasize that a post-CSD increase in the activity of the enzyme superoxide dismutase, as well as CSD modulation by nitric oxide, has been observed in the rat cortex (Petzold et al., 2008; Viggiano et al., 2011). We believe that CSD is a valuable, interesting, and very reproducible experimental phenomenon that can expand our comprehension of the causal relationship between oxidative stress and the generation of some neurological diseases (Guedes et al., 2012). Although the mechanisms by which AA modulates CSD propagation are not yet known, we can speculate based on CSD studies of mechanisms that are proposed to be implicated in the neural actions of AA. As a strong water-soluble reducing agent, AA normally acts as an antioxidant (Machlin and Bendich, 1987) that effectively scavenges free radicals, including reactive oxygen species (Retsky et al., 1993), and protects the brain against oxidative stress, particularly in neurodegenerative diseases (Ballaz et al., 2013; Rebec et al., 2003).

Another interesting possibility is that perhaps the action of AA at the glutamate synapse (Smythies, 1999) is involved in modulating CSD propagation. The balance between AA and glutamate can modulate neuronal vulnerability to degeneration (Ballaz et al., 2013). Glutamatergic stimulation can result in the accumulation of reactive oxygen species and the subsequent release of nitric oxide (Kostandy, 2012). Therefore, nitric oxide excitability-related neuropathological phenomena (Bell et al., 1996; Yildirim et al., 2010) may contribute to the effects of AA on the brain. All of the above evidence notwithstanding, the role of AA in redox mechanisms at the brain nitroergic and glutamate synapses should be addressed in future investigations. Interestingly, our group has recently demonstrated that administering

monosodium glutamate accelerates CSD in a dose-dependent fashion and induces significant microglial reaction in the rat cerebral cortex (Lima et al., 2013).

Early malnutrition impairs brain developmental processes such as synaptogenesis, dendritic development, and myelination (Morgane et al., 1978; Picanço-Diniz et al., 1998). These processes may be involved in facilitating CSD effects, as previously reported in malnourished rats (Rocha-de-Melo and Guedes, 1997) and confirmed in the present investigation. The body-weight reductions observed in the malnourished groups of the present study (Fig. 1) unequivocally demonstrate the effectiveness of the regional basic diet in inducing malnutrition. Deficiencies in the protein content of the maternal diet certainly are crucial in determining the CSD effect in offspring (Guedes, 2011).

The mechanism by which early malnutrition enhances CSD propagation has been the subject of much discussion. Malnutrition reportedly reduces the uptake of extracellular glutamate (Feoli et al., 2006), which may facilitate CSD propagation (Tottene et al., 2009). Malnutrition-induced increases in cell packing density are accompanied by reductions in the volume of the extracellular space, which are thought to increase the CSD propagation rate (Guedes, 2011). Two other conditions that accelerate CSD are present in the early malnourished brain: impairment of glial function (Largo et al., 1997) and hypomyelination (Merkler et al., 2009). Merkler et al. demonstrated an inverse correlation between the degree of cortical myelination and the CSD propagation velocity, using animal models of cuprizone-induced demyelination and genetically modified hypermyelinated animals; dichotomous modulation of CSD propagation based on myelin content was revealed in these studies. In this context, it is interesting that adult rats previously suckled under favorable conditions (reduced litter size, with only three pups) displayed lower CSD propagation velocities than normally suckled controls (Rocha-de-Melo et al., 2006), suggesting links among early nutritional status, myelination, and CSD propagation.

In conclusion, our findings demonstrate that a low dose (30 mg/kg/d) of AA decelerates CSD propagation and decreases MDA levels in the cortex. At higher doses (60 mg/kg/d and 120 mg/kg/d), AA augments CSD velocity and increases cortical MDA levels. These differential, dose-dependent effects are not abolished by malnutrition. We suggest that AA acts as an antioxidant when administered at low doses but as a prooxidant when given at high doses. It is uncertain whether this novel AA effect can be extrapolated from the rat to the human developing brain. Based on this evidence, we consider that it is reasonable to recommend caution regarding the AA doses used in developing organisms for therapeutic purposes.

5. Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE- IBPG-0769-2.07/11), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no. 4191), and Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT nº 573604/2008-8). R.C.A. Guedes is a Research Fellow of the CNPq (nº 301190/2010-0).

6. References

- Abadie-Guedes, R., Santos, S.D., Cahú, T.B., Guedes, R.C.A., Bezerra, R.S., 2008. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32, 1417–1421.
- Aydogan, M., Korkmaz, A., Barlas, N., Kolankaya, D., 2008. The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology* 249, 35–39.
- Ayyildiz, M., Coskun, S., Yildirim, M., Agar, E., 2007. The effects of ascorbic acid on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsia* 48, 1388–1395.
- Ballaz, S., Morales, I., Rodríguez, M., Obeso, J.A., 2013. Ascorbate prevents cell death from prolonged exposure to glutamate in an in vitro model of human dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 91, 1609–1617.
- Bell, J.A., Beglan, C.L., London, E.D., 1996. Interaction of ascorbic acid with the neurotoxic effects of NMDA and sodium nitroprusside. *Life Sci.* 58, 367–371.
- Bhaskar, S., Saeidi, K., Borhani, P., Amiri, H., 2013. Recent progress in migraine pathophysiology: role of cortical spreading depression and magnetic resonance imaging. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3540–3551.
- Braugher, J.M., Hall, E.D., 1989. Central nervous system trauma and stroke: I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 289–301.
- Bureš, J., Burešová, O., Křivánek, J., 1974. The mechanism and applications of Leão's spreading depression of electroencephalographic activity, ed. Academic Press, New York.

- Busija, D.W., Bari, F., Domoki, F., Horiguchi, T., Shimizu, K., 2008. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. *Prog. Neurobiol.* 86, 379-395.
- Cardoso, H.D., Passos, P.P., Lagranha, C.J., Ferraz, A.C., Santos Júnior, E.F., Oliveira, R.S., Oliveira, P.E., Santos, R.C., Santana, D.F., Borba, J.M., Rocha-de-Melo, A.P., Guedes, R.C.A., Navarro, D.M., Santos, G.K., Borner, R., Picanço-Diniz, C.W., Beltrão, E.I., Silva, J.F., Rodrigues, M.C., Andrade-da-Costa, B.L., 2012. Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. *Front. Hum. Neurosci.* 6, doi 10.3389/fnhum.2012.00249.
- Chen, J.C., Turiak, G., Galler, J., Volicer, L., 1997. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 257–263.
- Costa-Cruz, R.R.G., Amâncio-dos-Santos, A., Guedes, R.C.A., 2006. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosci Lett.* 401, 271-275.
- Dreier, J.P., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439-447.
- El-Bachá, R.S., Lima-filho, J.L., Guedes, R.C.A., 1998. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. *Nutr. Neurosci.* 1, 205–212.
- Fabircius, M., Fuhr, S., Willumsen, L., Dreier, J.P., Bhatia, R., Boutelle, M.G., Hartings, J.A., Bullock, R., Strong, A.J., Lauritzen, M., 2008. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin. Neurophysiol.* 119, 1973–1984.

- Feoli, A.M., Siqueira, I.R., Almeida, L., Tramontina, A.C., Vanzella, C., Sbaraini, S., Schweigert, I.D., Netto, C.A., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., 2006. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 22, 160-165.
- Gorji, A., Speckmann, E.J., 2004. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3371–3374.
- Grantham-McGregor, S., 1995. A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *J. Nutr.* 125, 2233S–2238S.
- Guedes, R.C.A., Cavaleiro, E.A., 1997. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Res.* 27, 33-40.
- Guedes, R.C.A., 2011. Cortical spreading depression: a model for studying brain consequences of malnutrition, in: Preedy, V.R., Watson, R.R., Martin, C.R. (Eds.), *Handbook of behavior, food and nutrition*. Springer, Berlin, pp. 2343–2355.
- Guedes, R.C.A., Abadie-Guedes, R., Bezerra, R.S., 2012. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. *Nutr. Neurosci.* 15, 111-119.
- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, 1609–1623.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658.
- Hisanaga, K., Sagar, S.M., Sharp, F.R., 1992. Ascorbate neurotoxicity in cortical cell culture. *Ann. Neurol.* 31, 562–565.
- Koroleva, V.I., Bures, J., 1980. Blockade of cortical spreading depression in electrically and chemically stimulated areas of cerebral cortex in rats. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 48, 1-15.

- Kostandy, B.B., 2012. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol. Sci.* 33, 223-237.
- Largo, C., Ibarz, J.M., Herreras, O., 1997. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J. Neurophysiol.* 78, 295-307.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359–390.
- Levitsky, D.A., Strupp, B.J., 1995. Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J. Nutr.* 125, 2212S–2220S.
- Lima, C.B., Soares, G.S., Vitor, S.M., Castellano, B., Andrade-da-Costa, B.L.S., Guedes, R.C.A., 2013. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. *Life Sci.* 93, 388-392.
- Machlin, L.J., Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1, 441-445.
- Mehla, J., Reeta, K.H., Gupta, P., Gupta, Y.K., 2010. Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. *Life Sci.* 87, 596–603.
- Merkler, D., Klinker, F., Jürgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B.G., Sereda, M.W., Stadelmann-Nessler, C., Guedes, R.C.A., Brück, W., Liebetanz, D., 2009. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.* 66, 355-365.
- Miura, S., Ishida-Nakajima, W., Ishida, A., Kawamura, M., Ohmura, A., Oguma, R., Sato, Y., Takahashi, T., 2009. Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic ischemia. *Brain Dev.* 31, 307–317.

- Monte-Guedes, C.K., Alves, E.V., Viana-da-Silva, E., Guedes, R.C.A., 2011. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. *Neurosci. Lett.* 496, 191-194.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E., Resnick, O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2, 137-230.
- Mori, A., Hiramatsu, M., Yokoi, I., Edamatsu, R., 1990. Biochemical pathogenesis of post-traumatic epilepsy. *Pavlovian J. Biol. Sci.* 25, 54-62.
- Murashima, Y.L., Kasamo, K., Suzuki, J., 1998. Antiepileptic effects of allopurinol on EL mice associated with changes in SOD isoenzyme activities. *Epilepsy Res.* 32, 254-265.
- Netto, M., Martins-Ferreira, H., 1989. Elicitation of spreading depression by rose Bengal photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 50, 229-234.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F.F., Figuera, M.R., Myskiw, J.C., Fiorenza, N.G., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721-728.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 22, 18-35.
- Petzold, G.C., Haack, S., von Bolden und Halbach, O., Priller, J., Lehmann, T.N., Heinemann, U., Dirnagl, U., Dreier, J.P., 2008. Nitric oxide modulates spreading depolarization threshold in the human and rodent cortex. *Stroke* 39, 1292-1299.

- Picanço-Diniz, C.W., Araújo, M.S., Borba, J.M.C., Guedes, R.C.A., 1998. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr. Neurosci.* 1, 35–48.
- Rebec, G.V., Barton, S.J., Marseilles, A.M., Collins, K., 2003. Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport.* 14, 1263-1265.
- Retsky, K.L., Freeman, M.W., Frei, B., 1993. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J. Biol. Chem.* 268, 1304–1309.
- Rocha-de-Melo, A.P., Guedes, R.C.A., 1997. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 663-669.
- Rocha-de-Melo, A.P., Cavalcanti, J.B., Barros, A.S., Guedes, R.C.A., 2006. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9, 155–160.
- Rogawski, M.A., 2008. Common pathophysiologic mechanisms in migraine and epilepsy. *Arch. Neurol.* 65, 709-714.
- Simeone, K.A., Matthews, S.A., Samson, K.K., Simeone, T.A., 2014. Targeting deficiencies in mitochondrial respiratory complex I and functional uncoupling exerts anti-seizure effects in a genetic model of temporal lobe epilepsy and in a model of acute temporal lobe seizures. *Exp. Neurol.* 251, 84-90.
- Smythies, J., 1999. Redox mechanisms at the glutamate synapse and their significance: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 370, 1–7.

- Song, J.H., Shin, S.H., Ross, G.M., 2001. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Res.* 895, 66–72.
- Teodósio, N.R., Lago, E.S., Romani, S.A.M., Guedes, R.C.A., 1990. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoam. Nutr.* 40, 533–547.
- Tottene, A., Conti, R., Fabbro, A., Vecchia, D., Shapovalova, M., Santello, M., van den Maagdenberg, A.M., Ferrari, M.D., Pietrobon, D., 2009. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61, 762–773.
- Viggiano, A., Viggiano, E., Valentino, I., Monda, M., Viggiano, A., De Luca B., 2011. Cortical spreading depression affects reactive oxygen species production. *Brain Res.* 1368, 11–18.
- Yildirim, M., Ayyildiz, M., Agar, E., 2010. Endothelial nitric oxide synthase activity involves in the protective effect of ascorbic acid against penicillin-induced epileptiform activity. *Seizure* 19, 102–108.
- Zalani, S., Rajalakshmi, R., Parekh, L.J., 1989. Ascorbic acid concentration of human fetal tissues in relation to fetal size and gestational age. *Br. J. Nutr.* 61, 601–606.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise dos resultados desta dissertação permite as seguintes conclusões:

- A administração oral de ácido ascórbico, durante o período crítico do desenvolvimento cerebral, nas doses de 30, 60 e 120 mg/Kg/dia exerceu um efeito sobre a DAC, que se mostrou dependente da dose;
- Na dose mais baixa (30 mg/kg/dia) o AA diminuiu a velocidade de propagação da DAC e os níveis de MDA no córtex, enquanto que nas doses mais altas (60 mg/kg/dia e 120 mg/kg/dia) o AA aumentou a velocidade de propagação da DAC, assim como os níveis corticais de MDA.
- Este efeito dependente da dose ocorreu também no cérebro previamente desnutrido, indicando que a desnutrição não inibe a ação do AA sobre a DAC e os níveis de MDA;
- O déficit ponderal apresentado pelos animais que receberam a DBR indica a eficácia da dieta em promover a desnutrição energético-protéica, confirmando estudos anteriores.
- O peso corporal, dos animais de mesmo grupo nutricional, não foi alterado com a administração de ácido ascórbico.

Como perspectivas, propõe-se:

- Dar prosseguimento à linha de pesquisa utilizando o AA e a DAC durante o doutorado;
- Ao lado de medidas bioquímicas de estresse oxidativos, realizar análises imunohistoquímicas com marcadores específicos de células cerebrais;
- Investigar a interação do ácido ascórbico com fatores que induzem alto nível de estresse oxidativo, como a pilocarpina;

ANEXO 01 – Parecer aprobatório da Comissão de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 01 de junho de 2012.

Ofício nº 439/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Rubem Carlos de Araújo Guedes**
Departamento de Nutrição-UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.013959/2012-79

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“VITAMINA C E DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: CORRELAÇÃO ENTRE A DOSE DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO E EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS JOVENS EM DISTINTOS ESTADOS NUTRICIONAIS”**.

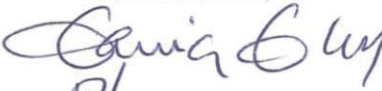
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos; Número de animais previsto no protocolo: 80 ratos; Peso: 05-06 gramas (nascimento); Idade: 01 a 45 dias.

Atenciosamente,


 Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA