

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**AÇÃO NEUROTÓXICA DO GLUTAMATO MONOSSÓDICO SOBRE O CÉREBRO
DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO: AVALIAÇÃO ELETROFISOLÓGICA DA
INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA**

CÁSSIA BORGES LIMA

RECIFE, 2013

CÁSSIA BORGES LIMA

Ação neurotóxica do glutamato monossódico sobre o cérebro de ratos em desenvolvimento: avaliação eletrofisiológica da influência da atividade física.

Tese a ser apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador:

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Recife, 2013.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Cássia Borges

Ação neurotóxica do glutamato monossódico sobre o cérebro de ratos em desenvolvimento: avaliação eletrofisiológica da influência da atividade física/ Cássia Borges Lima– Recife: O Autor, 2013.

99 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Cérebro 2. Glutamato monossódico 3. Eletrofisiologia I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (orientador) II. Título**

612.82

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 333

CÁSSIA BORGES LIMA

Ação neurotóxica do glutamato monossódico sobre o cérebro de ratos em desenvolvimento: avaliação eletrofisiológica da influência da atividade física.

Tese a ser apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Profa. Dra. Juliana Maria Carrazonne Borba

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues

Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Dedico à minha filha Talita, razão de toda minha alegria.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubem Guedes por seu apoio, dedicação e exemplo de profissional e ser humano.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Rubem Guedes pela oportunidade, confiança, dedicação e profissionalismo. Não apenas orientador, mas um mestre.

Agradeço à profa. Dra. Ana Castrucci (USP) que me apoiou e orientou nos meus primeiros passos na pesquisa, durante o mestrado, com muita dedicação e carinho.

À profa. Dra. Belmira, uma pessoa encantadora e profissional sempre disposta a transmitir seu conhecimento.

Ao Prof. Vivaldo Moura Neto, e a todos do seu laboratório, pelo acolhimento e ensinamentos durante meu estágio na UFRJ, durante convenio Procad UFPE/UFRJ/UFBA (no. 131/2007).

Aos Profs. Dr. Bernardo Castellano e Dra. Berta Gonzáles da Universidade Autônoma de Barcelona, por terem aberto as portas de seu laboratório durante minha permanência naquela universidade (estágio “doutorado-sanduíche”, com bolsa da Capes/Fundação Carolina). À Maristela Andréa por toda ajuda em Barcelona e a todos do laboratório da Unidade de Histologia Médica.

A todos do LAFINNT, particularmente às professoras Juliana, Ana Paula e Surama. À Fernanda e Lúcia e aos demais que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa tornando o ambiente de trabalho tranquilo e cooperativo.

Agradeço ao companheirismo e parceria de Geórgia, à amizade e carinho de Érica e Dani, as ajudas tecnológicas de Andréa, Rosangela e Ricardo, auxílio logístico de Thays, ao apoio de Mariana, Manuella, Regina e Elian e aos demais pós graduandos. De forma especial aos conselhos e presença sempre amiga de Noranege e Raquel Cruz.

Agradeço a ajuda dos estagiários especialmente Suênia Marcele que perseverou com dedicação e responsabilidade.

À pós graduação em Bioquímica e Fisiologia e aos órgãos de fomento: Facepe, CNPq, Capes/Proacad, Capes/Fundação Carolina.

Agradeço ao Sr França que esteve sempre empenhado em auxiliar durante a pesquisa.

A meus irmãos Romesnir, Amauri, Rosemeire e Rosy e sobrinhos por incentivar e acreditar em minha formação científica. À minha filha Talita que dá sentido a tudo.

Agradeço respeitosa e humildemente aos animais sem os quais nada disso teria sido possível.

RESUMO

Glutamato monossódico (MSG) é um aminoácido neuroexcitatório utilizado como reforçador do sabor dos alimentos (“agente flavorizante”). Em altas doses, pode ser prejudicial ao sistema nervoso central, às células neuronais e gliais, podendo esse efeito ser mais severo durante o cérebro em desenvolvimento. Em ratos, o MSG no período neonatal pode induzir neurotoxicidade, afetando a organização morfológica e eletrofisiológica do encéfalo. Por outro lado, o exercício físico induz efeitos positivos no sistema nervoso de mamíferos. Neste trabalho, investigamos, em ratos tratados com MSG e/ou exercício físico em esteira, efeitos eletrofisiológicos (mudanças relacionadas ao fenômeno designado como depressão alastrante cortical [DAC]) e morfológicos (reação microglial expressa pela imuno-marcação com anticorpos anti-Iba1 no cortex motor). Ratos Wistar receberam MSG (2 ou 4g/kg, n=22 e 24, respectivamente; grupos MSG-2 e MSG-4), ou solução salina (n=23), ou nenhum tratamento (grupo ingênuo, n=11) a cada dois dias, nos primeiros 14 dias de vida pós-natal. Após o desmame, os três grupos foram subdivididos em exercitados (esteira motorizada, 3 semanas, 5 dias/semana, durante 30 minutos, n=47), ou sedentários (n=33). Dois dias após o final do exercício, sob anestesia, a DAC foi induzida por KCl em um ponto da superfície cortical, e o registro da atividade elétrica cortical foi realizado durante 4h. Um grupo adicional foi utilizado para estudo imunohistológico de células microgliais. O grupo MSG-4 apresentou velocidade média (em mm/min) significativamente mais elevada ($4,59 \pm 0,34$), em comparação com os outros grupos (salina: $3,84 \pm 0,20$; ingênuo: $3,71 \pm 0,8$; MSG-2: $3,75 \pm 0,10$). Em comparação com os sedentários, o exercício físico reduziu a velocidade da DAC em todos os grupos (salina: $3,31 \pm 0,19$; Ingênuo: $3,25 \pm 0,17$; MSG-2: $3,49 \pm 0,19$; MSG-4: $4,05 \pm 0,18$ mm/min, $P < 0,05$). Nós concluímos que o tratamento neonatal com MSG facilita a propagação da DAC, enquanto que o exercício desacelera a sua propagação. Ambos os tratamentos (MSG e Exercício físico) exercem influência na imunoreatividade da microglia, aumentando-a. Os dados sugerem cuidado na utilização de MSG como reforçador do sabor dos alimentos, principalmente no organismo em desenvolvimento (crianças) e indicam que o exercício físico pode exercer influência no desenvolvimento e função cerebrais.

Palavras-chave: Desenvolvimento Cerebral. Glutamato Monossódico. Eletrofisiologia. Exercício.

ABSTRACT

Monosodium glutamate (MSG) is a neuroexcitatory amino acid, WHICH IS USED AS reinforcing agent in the taste of food. In high doses, it can be harmful to the central nervous system, affecting glial and neuronal cells, particularly during brain developing. In rats, administration of MSG in the neonatal period can induce neurotoxicity affecting the electrophysiological and morphological organization of THE BRAIN. On the other hand, exercise is known to induce several positive effects in the nervous system of mammals. In this work, we investigated in rats, treated with MSG and/or treadmill exercise, the electrophysiological (changes related to the phenomenon known as cortical spreading depression; [DAC]) and the microglial reaction expressed as Iba1-immunolabeled cells in the rat motor cortex. Male Wistar rats were treated with MSG (2 or 4g/kg, n=22 and 24, respectively; groups MSG2 and MSG-4), or saline solution (n=23), or no treatment (group naive, n=11), every two days in the first 14 days of postnatal life. After weaning, the three groups were subdivided into exercised (treadmill exercise, 3 weeks of training, 5 days/week, for 30 minutes, n=47) or sedentary (n=33). Two days after the training period, under anesthesia, the DAC was induced by KCl at a point on the cortical surface, and the recording of brain electrical activity was performed for 4h. An additional group was used for the immunohistological characterization of microglial cells immunolabelled with a polyclonal antibody against the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1). The MSG-4 group showed a CSD speed (in mm / min) significantly higher (4.59 ± 0.34) in comparison with the other three groups (saline: 3.84 ± 0.20 ; naive: 3.71 ± 0.8 ; MSG-2: 3.75 ± 0.10). Compared to the sedentary animals, the exercise decelerated DAC in all groups (saline: 3.31 ± 0.19 ; Naive: 3.25 ± 0.17 ; MSG-2: 3.49 ± 0.19 ; MSG-4: 4.05 ± 0.18 mm / min, $P < 0.05$). We concluded that MSG treatment during the neonatal period facilitates the CSD propagation, whereas the exercise decelerated it. Finally, both exercise and neonatal treatment with MSG increased the Iba1 immunoreactivity of microglia. The data suggest caution in the use of MSG as a flavor enhancer in food, especially during organism development (in childhood), indicating also that treadmill exercise can influence brain development and functioning.

Key words: Brain development. Monosodium glutamate. Cortical spreading depression. Exercise.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. OBJETIVOS	24
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	26
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE 1- ARTIGO CIENTÍFICO 1(ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)	38
APÊNDICE 2- ARTIGO CIENTÍFICO 2(SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO)	64
APÊNDICE 3 - ARTIGO CIENTÍFICO3	90
ANEXO 01 Parecer do Comité de Ética	96
ANEXO 02: Comprovante de Aceitação do Artigo 1	97
ANEXO 03: Comprovante de submissão do artigo 2	98

1. INTRODUÇÃO

Glutamato monossódico

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central dos mamíferos (Swanson et al., 2005). Sua sinalização é mediada por uma família diversa de receptores ionotrópicos (iGLU) e metabotrópicos (mGlu) que se encontram amplamente distribuídos na membrana celular de neurônios e de células gliais. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos de multi-subunidades que medeiam respostas de duração muito rápida por meio do glutamato, promovendo a abertura e fechamento dos poros, permitindo o fluxo de íons através da membrana celular, o que altera a concentração iônica intracelular (Ferraguti e Shigemoto, 2006). Os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G, receptores cujos efeitos são mediados por uma alteração na concentração de sistemas de segundo mensageiro (Swanson et al., 2005). Assim, a sinalização através destes receptores é mais lenta e mais duradoura comparada a receptores ionotrópicos, produzindo um efeito modulador desses receptores, permitindo um ajuste fino da resposta celular à sinalização por glutamato (Conn e Pin, 1997).

Estudos mostram que receptores de Glu (Glu-R) especificamente o receptor do tipo NMDA (NMDA-R), desempenham um papel durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Eles mediam funções como sobrevivência, estrutura neuronal, sinaptogênese e plasticidade sináptica (Lo Turco et al, 1991,. Komuro e Rakic, 1993). Receptores de glutamato (Glu-R) podem sofrer alterações de composição molecular durante o desenvolvimento pós-natal em ratos; assim sugere-se que eventos moleculares regionais e temporais durante o desenvolvimento, podem determinar a susceptibilidade dos neurônios

para os efeitos do glutamato ou seus análogos (Conn e Pin, 1997). Sugere-se que a regulação “para cima” (up regulation) de Glu-R durante os primeiros dias após o nascimento pode modificar a composição molecular de receptores do tipo NMDA, alterar comunicação interneuronal e, conseqüentemente, interferir em processos críticos de desenvolvimento normal no cérebro de ratos (Xia et al, 1995.; Zhong et al., 1996).

Embora os receptores mGlu possam mediar os seus efeitos através da alteração de sistemas de segundo mensageiro, sua influência celular final pode ser diversificada e abrangente, incluindo a regulação de canais iônicos, a mediação de respostas excitatórias e inibitórias, influenciando as ações de outros receptores (Ferraguti e Shigemoto, 2006).

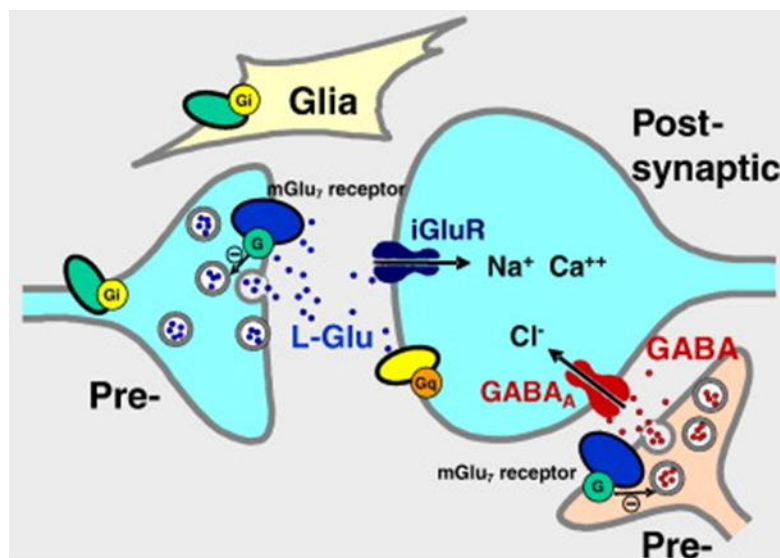


Fig. 1) – Esquema de transdução sináptica de receptores de glutamato e ação do neurotransmissor inibitório (GABA), sobre o neurônio pós sináptico (O'Connor, 2010).

Glutamato monossódico (MSG) é um constituinte natural de muitos produtos alimentares ricos em proteínas, tais como queijo, carnes e alguns vegetais. Ele é utilizado em todo o mundo como um intensificador de sabor aumentando a palatabilidade dos alimentos e, conseqüentemente, a sua ingestão. O ácido L-glutâmico é o amino-ácido componente de

MSG, adicionado quer como um sal monossódico purificado ou como um componente de uma mistura de aminoácidos e de péptidos pequenos. Independentemente da fonte de alimentos, todas as moléculas de glutamato que entram na circulação a partir do trato gastrointestinal, são estruturalmente idênticas (Geha et al, 2000). De modo geral, a ingestão média diária de MSG, por uma pessoa adulta, é estimada em 0,3-1,0 g em países industrializados, mas, ocasionalmente pode ser maior, dependendo do teor de MSG dos itens alimentares e preferências individuais de sabor (Geha et al, 2000). O glutamato tem uma toxicidade aguda muito baixa. Em circunstâncias normais, a dose oral que é letal para 50% dos sujeitos (LD50) em ratos e camundongos é 15-18 g/kg por peso corporal. Na população humana, alguns indivíduos tem uma maior intolerância do que outros, ao MSG consumido na dieta (Walker e Lupien, 2000). O MSG já foi acusado de causar males à saúde, desencadeando alguns sintomas, designados coletivamente como " Síndrome do restaurante chinês", consistindo de dormência na parte posterior do pescoço e dos braços, fraqueza e palpitações (Geha et al. 2000).

Glutamato Monossódico e Obesidade

Na última década, uma nova e desafiante hipótese tem ligado o consumo de quantidades elevadas do aminoácido glutamato (GLU) com obesidade, hiperfagia, e deficiência de hormônio de crescimento (Hermanussen e Tresguerres, 2003a, b). Doses suprafisiológicas de GLU são tóxicas para as células neuronais (Hermanussen e Tresguerres, 2006). Um modelo amplamente utilizado para estudar esta questão em animais experimentais consiste em tratar os animais com a administração subcutânea repetida de glutamato monossódico (MSG). Em ratos adultos e macacos tratados previamente com MSG no início da vida têm sido relatadas o desenvolvimento de lesões cerebrais e obesidade (Abraham et al, 1971).

O aumento da incidência da obesidade na sociedade moderna parece ser uma consequência da associação entre fatores orgânicos (predisposição genética e hormonal) e vários fatores exógenos, incluindo excesso de consumo de dietas ricas em gordura e sedentarismo, facilitado pelo uso excessivo de aparatos da vida moderna, tais como controles remotos e alguns jogos eletrônicos. Os primeiros reduzem a atividade física diária, enquanto que os últimos reduzem o tempo dispendido pelo indivíduo em praticar exercícios físicos. O fato de que a incidência de obesidade também vem aumentando na infância é motivo de grande preocupação (Dachs, 2007).

Em animais de experimentação, tem sido descrito um modelo que mimetiza, pelo menos em parte, a situação clínica de síndrome metabólica rotulada como obesidade neuroendócrina. Assim, em ratos, essa obesidade pode ser conseguida, na vida adulta, por meio da administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG) durante o desenvolvimento, uma vez que este é um aminoácido neuroexcitatório que pode ser lesivo ao sistema nervoso central quando administrado em grande quantidade (Kizer et al, 1978). A administração de MSG durante o período neonatal leva à destruição de corpos celulares neuronais localizados no SNC, devido ao fato de que, nesse período, a barreira hematoencefálica não está totalmente desenvolvida. Essas lesões ocorrem principalmente em neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (Dawson et al, 1997), produzindo a denominada obesidade hipotalâmica por meio de diversas alterações metabólicas, como hiperinsulinemia e prejuízo da termogênese (Pereira et al, 2003); essa degeneração aguda do núcleo arqueado do hipotálamo leva, além da obesidade, à disfunção sexual, parada no crescimento, déficit comportamental (Dawson et al, 1983) além de alterações no controle cardiovascular (Dawson et al, 1989). Animais obesos deste modelo experimental desenvolvem maior deposição de tecido adiposo na região central (visceral) do corpo (Hirata et al, 1997). As doses de MSG que

levam ao desenvolvimento de obesidade com grande acúmulo de gordura visceral variam de 2 a 4 g/kg de peso do rato e podem ser administradas até um total de 4 a 10 doses, em dias alternados, no início da vida (De Mello et al, 2001).

Segundo alguns autores, animais tratados com MSG apresentam menor atividade do hormônio sensível à lipase (enzima responsável pela lipólise) e menor expressão de seu mRNA no tecido adiposo. Além disso, o número de receptores de insulina acha-se elevado nos adipócitos de ratos tratados com MSG do que em ratos controles (Dolnikoff, et al, 2001). De qualquer forma, o acúmulo excessivo de tecido adiposo visceral nos animais MSG parece estar relacionado a um desbalanceamento entre respostas lipolíticas e atividades lipogênicas. Tem sido relatado que animais tratados com MSG são hipoativos e o desenvolvimento da obesidade nestes foi relacionada ao menor gasto energético em certos períodos do dia (Tokuyama, 1996). Também já foi demonstrado que a obesidade hipotalâmica desenvolvida pelo tratamento com MSG induz a um significativo aumento de peso após os 60 dias de vida (Sun et al, 1991; Zhang et al, 1994; Lobato et al, 2011).

Glutamato Monossódico e Sistema Nervoso

A influência do MSG é em geral mais acentuada nos machos do que nas fêmeas. Uma vez que o consumo de MSG tem atividades excitotóxicas e implica em estresse oxidativo, a diferença de gênero pode ser explicada pela atividade antioxidante de estrógenos (Ruiz-Larrea et al., 1997; Cuzzocrea et al., 2001). Como previamente demonstrado, estrógenos possuem uma importante atividade neuroprotetora (Azcoitia et al., 1999).

Em relação ao sistema nervoso, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos; estimula os receptores de glutamato e desempenha um papel importante tanto em processos fisiológicos como nos patológicos (Mattson 2008; Ganong 2005).

O SNC é um importante órgão-alvo para as ações do MSG, particularmente durante o desenvolvimento do cérebro. No rato, a maturação cerebral ocorre principalmente durante o período de lactação, numa fase em que a sinaptogênese é intensa, e que correspondente ao período de sinaptogênese no cérebro humano, isto é, aproximadamente, ao primeiro ano de vida (Dobbing, 1968; Morgane et al, 1993). A relevância de nosso estudo para o funcionamento do cérebro humano é baseado no fato de que uma parte crescente da população humana, incluindo crianças, consome MSG como reforçador de sabor dos alimentos. Em países europeus e asiáticos, o aumento do consumo de MSG é um assunto de grande preocupação (Beyreuther et al, 2007), não só devido ao crescente risco de obesidade, mas também devido aos efeitos neurotóxicos que podem ocorrer com o alto consumo de MSG. Doses excessivas de glutamato contribuem para o aparecimento de insultos neurológicos em ratos neonatos (Goldsmith, 2000) e depressão de longa duração (LTD; do inglês “long term depression”) em ratos adultos (Calabresi et al. 1999). Nestes, a administração prolongada de altas doses de MSG resulta em mudanças neurodegenerativas em células piramidais (Musa, 2013). A ativação excessiva de receptores glutamatérgicos, contribui para uma vasta gama de insultos neurológicos incluindo trauma, isquemia e crises epiléticas (dependendo da via de administração), e várias desordens neurodegenerativas crônicas do cérebro humano (Pelligrini-Giampetro et al. 1997). Entretanto, mecanismos pelos quais MSG exerce suas ações sobre o sistema nervoso ainda não estão totalmente esclarecidos. Hermanussen e Tresguerres (2005) mostraram um aumento nos níveis de Glu e da ativação de receptores GLU após a administração neonatal de 4 g/kg de peso corporal, de MSG. Eles também relataram mudanças importantes na composição molecular de receptores do tipo NMDA, com sinais de dano neuronal e um aumento na reatividade de células gliais. É interessante notar que a reatividade das células microgliais se mostrou aumentada no

hipocampo sob condições de stress (Park et al, 2011) e envelhecimento (Viana et al, 2013). Um aumento da expressão de GFAP foi também encontrado e sugerido como sendo um efeito neuroprotetor após insulto neurotóxico ou metabólico causado por MSG (Hanbury et al. 2003). Estas alterações provavelmente influenciam a atividade elétrica do cérebro (Sadeghian et al, 2012).

Por outro lado, Kaufhold e colaboradores (2002) foram capazes de prevenir os efeitos adversos do tratamento neonatal com MSG realizando a administração concomitante de um antagonista não competitivo selectivo, e muito potente, de NMDA-R, o maleato de dizocilpina. Em geral, MSG tem sido apresentado com modulador da excitabilidade cerebral (Lopez-Perez et al, 2010). Isso pode ser relevante para fenômenos relacionados à excitabilidade, tais como a epilepsia e a Depressão alastrante cortical (DAC; Guedes e Cavalheiro, 1997; ver descrição da DAC mais adiante, no item 3).

Efeitos do MSG sobre a neurotoxicidade através da via da p38 (Torres et al, 2006) ou o aumento dos níveis de glutamato do cérebro após tratamento com MSG (Lopez-Perez et al, 2010) tem sido discutidos, mas ainda requerem corroboração com base em evidências experimentais mais robustas. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de que a administração de MSG durante o período crítico do desenvolvimento do cérebro pós-natal também possa influenciar outros sistemas de neurotransmissores, como por exemplo, o sistema GABA (Ureña-Guerrero et al, 2003, 2009). Além disso, durante o desenvolvimento o glutamato também pode desempenhar uma função neurotrófica, influenciando positivamente a diferenciação neuronal e a formação de seus circuitos (McDonald et al, 1990).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a ativação dos receptores de glutamato pode desempenhar um papel importante na morte neuronal que ocorre naturalmente, bem como em diversas doenças neurodegenerativas. Bojanic et al. (2004) relataram que o MSG

pode agir como uma excitotoxina. Ativação excessiva e prolongada dos receptores ionotrópicos de glutamato conduz à morte das células por excitotoxicidade e pode induzir a apoptose ou necrose, dependendo da intensidade da ativação desses receptores (Johnston, 2005). Concentrações elevadas de MSG por longos períodos, na região da fenda sináptica, ativaria excessivamente receptores de glutamato resultando na exaustão metabólica e funcional dos neurônios afetados e, conseqüentemente, a necrose neuronal (Gill, 2000; Mattson, 2008). Outros investigadores acrescentaram que aumento dos níveis de glutamato pode levar ao aumento do influxo de cálcio, stress oxidativo interno com a geração de radicais livres, disfunção mitocondrial, e, eventualmente, a apoptose (Goldsmith 2000; Daniels e Brown 2001; Jiang et al, 2005). Tanto a ativação do receptores de glutamato e alterações de fluxo de cálcio transmembrana são conhecidos por influenciar DAC, como demonstrado pelo nosso laboratório (Guedes et al, 1988) e por outros (Marranes et al, 1988; Siesjo e Bengtsson, 1989).

O sistema glutamatérgico demonstrou estar envolvido na regulação da excitabilidade cerebral em seres humanos (Stagg et al, 2011) e em animais de laboratório (El-Hassar et al, 2011). Curiosamente, Lopez-Perez e seus colegas demonstraram recentemente que filhotes de ratos tratados com MSG apresentaram alterações eletroencefalográficas e comportamentais, sugerindo um início de crise epiléptica (Lopez-Perez et al, 2010).

Além dos danos nas células cerebrais (Eweka e Om'Iniabo 2008), foi relatado que os efeitos neurotóxicos do MSG podem levar à degeneração da retina (Babai et al. 2006), epilepsia (Stafstrom 2004), desenvolvimento de inflamação hepática (Nakanishi et al. 2008) e oligozoospermia (Vinodini et al. 2008). MSG conduz à geração de radicais livres, ativação de proteases, fosfolipases e endo-nucleases, ativação da transcrição de programas apoptóticos e genotoxicidade em ratos (Goldsmith 2000; Farombi e Onyema 2006).

Em contraste com o conhecimento das alterações metabólicas provocadas pelo MSG, são escassas as informações na literatura acerca da atividade eletrofisiológica cerebral desses animais; com relação ao estudo dos efeitos neurais da associação MSG-exercício físico, nada encontramos na literatura. Para tais estudos eletrofisiológicos, um modelo interessante é o constituído pelo fenômeno denominado “depressão alastrante da atividade elétrica cerebral”, ou, simplesmente, depressão alastrante cortical (DAC), que será apresentado mais adiante (item 3).

2. Exercício físico

Se, por um lado, o consumo do MSG tem sido associado à obesidade, por outro lado, tem sido crescente a atenção dada ao exercício físico tanto como forma de melhorar a qualidade de vida, quanto como meio auxiliar para a prevenção da obesidade. Os estudos sobre o impacto do exercício no organismo foram focalizados primeiramente no sistema cardiorrespiratório, em parâmetros metabólicos e sua influência na saúde física. Esses estudos mostraram que o exercício físico melhora a saúde, beneficiando o sistema cardiovascular (ver Karacabey, 2005 para uma revisão). Hoje sabe-se que o exercício físico melhora o desempenho envolvendo funções neurais (Ozmerdivenli et al, 2005) e atenua efeitos neurais do envelhecimento (Batista-de-Oliveira et al, 2012; Latimer et al, 2011). O exercício físico promove diminuição de peso em ratos e isso resulta provavelmente do aumento da atividade mitocondrial, com a consequente mobilização e oxidação de ácidos graxos induzido pelo exercício (Moura et al, 2013). Se em ratos, o exercício ajuda na prevenção de distúrbios de parâmetros autonômicos, hemodinâmicos e metabólicos associados à síndrome metabólica

(Moraes-Silva et al 2013), nos seres humanos, a atividade física tem efeitos favoráveis sobre todos os componentes dessa síndrome (Montesi et al, 2013). Estas evidências suportam o postulado de que a prática de exercício físico no início da vida pós natal, pode contribuir para a prevenção da obesidade e resistência à insulina. A associação MSG-exercício pode causar uma série de efeitos metabólicos e diminuição do peso corporal, em animais exercitados por natação (Andreazzi et al, 2009; Miranda et al, 2013). À semelhança do que ocorre com o MSG, o exercício físico tem o córtex cerebral como uma importante área-alvo para as suas ações. Esses dois fatores –MSG e exercício-, nas redes celulares do córtex cerebral e no hipocampo, podem perturbar o equilíbrio fisiológico entre influências glutamatérgicos e GABAérgicas, como discutido por Ureña-Guerrero e colaboradores (2009) para o MSG.

No entanto, evidências recentes sugerem que existe também uma grande influência do exercício na função cerebral cortical, que parece estar ligada a melhora no desempenho cognitivo, excitação e bem-estar geral (Martinsen, 2008; Anish, 2005; Cotman et al, 2002). Nos seres humanos, o exercício é associado com a melhora da função cognitiva (Hillman, 2004) aprendizagem e memória (Van Praag et al, 2005).

O exercício em animais está associado à neurogênese e aumento da sobrevivência neuronal no hipocampo (Brown, 2003; Farmer, 2004; Van Praag et al, 1999; Van Praag et al, 1999b; Van Praag et al, 2005). Ele promove também o crescimento capilar e aumenta o fluxo vascular no cerebelo e córtex motor (Black et al 1990; Isaacs et al 1992; Swain et al, 2003). Os efeitos cerebrais do exercício incluem também o aumento da expressão de neurotrofinas em várias áreas do cérebro (Gomez-Pinilla et al, 2002; Neeper et al, 1995; Vaynman et al, 2004; Fang et al, 2013), alterações na expressão de genes (Tong, 2001), e valorização de potenciação de longo prazo no hipocampo (Farmer et al, 2004; Van Praag et al, 1999), moléculas de sinalização (Shen, 2001), alterações na expressão de genes (Tong, 2001) e

aumento da excitabilidade hipocampal (Fazendeiro et al, 2004). Portanto, os efeitos do exercício físico são mostrados como sendo neuroprotetores, promovendo a saúde do cérebro, o pré-condicionamento do cérebro contra o insulto isquêmico e melhora em seu funcionamento a longo prazo (Zhang et al, 2013). Nos animais adultos, estas alterações mediadas pelo exercício podem influenciar a excitabilidade cerebral e doenças neurológicas dependentes dessa excitabilidade (Peixinho-Pena et al, 2012).

Embora no momento exista uma carência de drogas neuroprotetoras eficazes destinadas a retardar processos neurodegenerativos, inúmeros relatos sugerem que o exercício e atividades físicas rotineiras também poderiam potencialmente reduzir o risco de comprometimento neurológico tais como acidente vascular cerebral, doença de Parkinson e outras doenças degenerativas (Eldar et, 2000; Cotman et al, 2002; Smith et al, 2003).

O exercício físico funcionalmente restaura os níveis da respiração mitocondrial, do ATP e da enzima antioxidante superóxido-dismutase (SOD), do corpo estriado (Lau et al, 2011). Foi ainda demonstrado que o exercício eleva os níveis endógenos de BDNF e GDNF na substância negra e corpo estriado, respectivamente. Isto é de particular importância durante o desenvolvimento, por ser o BDNF um importante regulador da plasticidade sináptica no cérebro (Rothman et al, 2013). Conclui-se que o exercício a longo prazo, não só evita os déficits neurocomportamentais e mitocondrial, que são associados com o modelo da doença de Parkinson crônica, mas o exercício também promove a atividade neurotrófica em neurônios nigroestriais no modelo de doença de Parkinson crônica (Lau et al, 2011).

Embora os efeitos do exercício físico sobre o sistema nervoso central (SNC) venham sendo bem documentados em animais adultos, pouco se sabe acerca de seus efeitos no cérebro em desenvolvimento. O desenvolvimento de estruturas altamente organizadas no SNC é um processo complexo e estímulos nesse período inicial da vida podem influenciar a integridade

funcional do cérebro na fase adulta. Eventos de experiência e aprendizagem podem modular a maturação funcional do cérebro por meio de processos de neuroplasticidade. Estímulos que ocorrem durante o desenvolvimento cerebral pós-natal precoce pode resultar no desenvolvimento de circuitos neurais mais complexos (Linkenhoker et al, 2005). Uma vez que a capacidade para a neuroplasticidade diminui com o aumento da idade (Akopian et al, 2006; Lynch et al, 2006), considera-se muito importante avaliar como o exercício pode regular benéficamente a neuroplasticidade no início da vida, e determinar o mecanismo básico de tais efeitos, no cérebro normal, em fases mais tardias da vida.

O exercício físico, tem sido considerado promotor de angiogênese no cérebro (Isaacs et al, 1992), e do aumento dos níveis de mRNA para os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (fazendeiro et al, 2004). Eventos de experiência e de aprendizagem associadas ao exercício em esteira no início da vida podem modular a maturação funcional do cérebro por meio de processos de neuroplasticidade. Os estímulos do meio ambiente que ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal do cérebro pode resultar em circuitos neurais mais complexos (Linkenhoker, 2005).

No sistema nervoso embrionário, os processos de neurogênese, gliogênese e migração neuronal são viabilizados pelos fenômenos da hiperplasia, hipertrofia e mielinização. Esses processos estão intensificados no que se chama de “período de crescimento rápido do cérebro” ou simplesmente o “período crítico”. Essa fase acha-se compreendida entre o terceiro trimestre gestacional e o segundo ano de vida, no homem, ou durante o período de aleitamento, no rato (Fig. 2; Morgane et al.; 1993). Ela é considerada crítica para o perfeito desenvolvimento e funcionamento neurológico, sendo uma etapa de grande vulnerabilidade a demandas internas e/ou externas, a exemplo daquelas aqui estudadas (exercício e MSG).

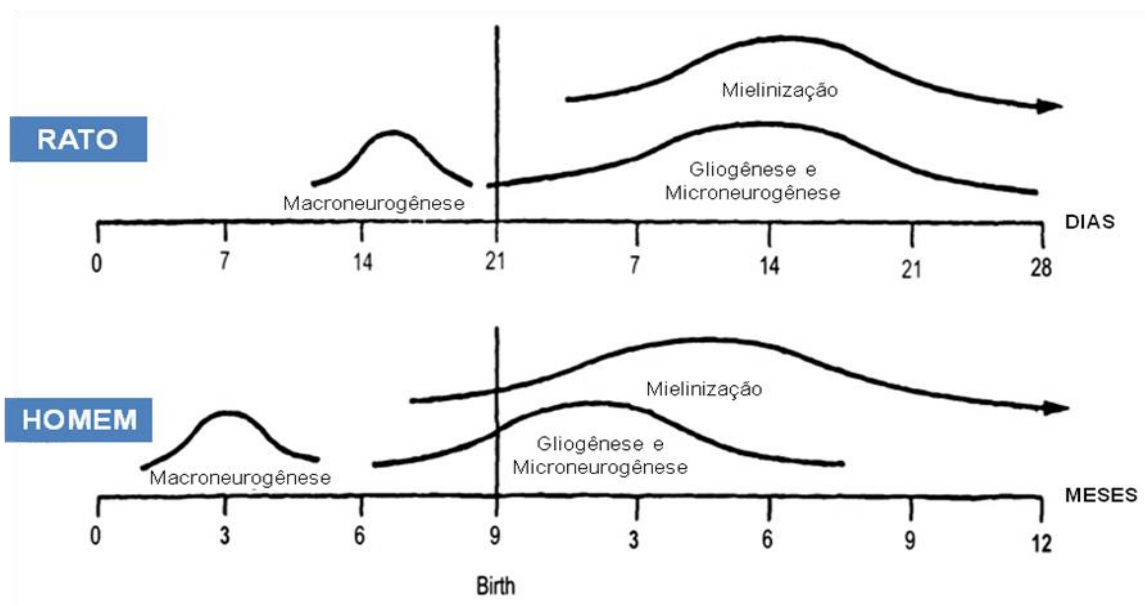


Figura 02: Comparação entre as etapas de desenvolvimento do sistema nervoso no homem e no rato, em relação ao nascimento. Adaptada de Morgane et al., 1993.

Portanto, em virtude do que foi acima apresentado, decidimos investigar, no cérebro de ratos desmamados, os efeitos do exercício físico, realizado no início da vida, associado ou não ao tratamento com MSG, sobre o fenômeno eletrofisiológico conhecido como "depressão alastrante cortical", que é apresentado a seguir.

3. Depressão Alastrante cortical (DAC)

A DAC foi descrita originalmente no coelho como uma redução ("depressão") da atividade elétrica cerebral (tanto a espontânea como a provocada), em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto da superfície cerebral. Essa resposta se propaga como uma "onda" reversível (toda a atividade se recupera após alguns minutos) acompanhada do aparecimento de uma "variação lenta de voltagem" (VLV), característica do fenômeno

(Leão, 1944; 1947). Essa propagação se dá de forma concêntrica a partir do ponto estimulado.

A Fig. 2 ilustra o fenômeno.

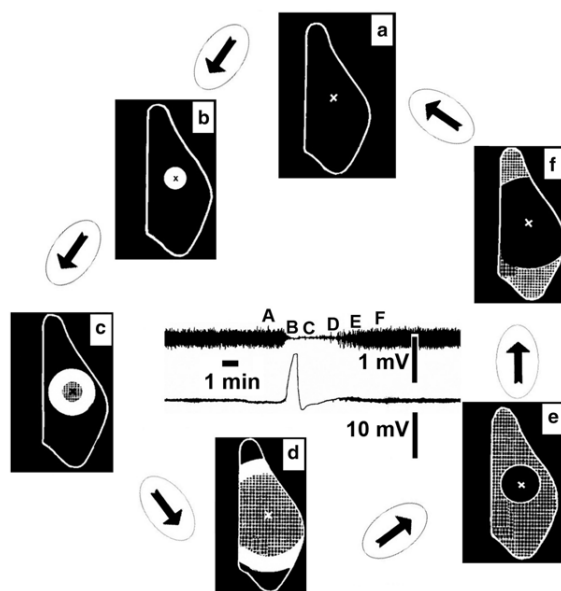


Fig 2) Ciclo de eventos reversíveis que ocorrem durante a depressão alastrante cortical. Sequencia de passos (A-F) que caracterizam o “ciclo de depressão alastrante cortical” no córtex cerebral do rato. Em A, o tecido cortical é estimulado no ponto marcado por um x e um episódio de DAC é originado deste ponto. O círculo branco marcado em B mostra a área inicialmente deprimida, com consequente propagação para áreas mais remotas do córtex (passos C e D). O círculo em preto mostrado em E indica a área inicialmente recuperada após a DAC. A recuperação é um processo gradual que se estende para áreas remotas (passo F) e finalmente o tecido cortical retorna à condição inicial pré-DAC, como em A. A área quadriculada representa a refratariedade cortical após a DAC, e antes da total recuperação. Ao centro, é mostrado o eletrocorticograma com a variação lenta de potencial da DAC, concomitante à depressão do eletrocorticograma. Os pontos temporais correspondentes às condições dos passos A-F, são marcados no eletrocorticograma com as respectivas letras.

Em todos os vertebrados (de peixes a mamíferos) onde já se foi registrada a DAC, sua velocidade de propagação tem se mostrado notavelmente baixa (de 2 a 5 mm/min), em comparação com a ordem de grandeza da propagação dos impulsos nervosos em axônios (até dezenas de m/s). O que levou alguns autores a postular um mecanismo humoral para a propagação do fenômeno. 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 et al, 1993).

Em pesquisas referentes a este tema, alguns fatores têm sido considerados relevantes. São eles: o possível envolvimento de certos íons, (Guedes et al, 1980, Siesjö et al, 1989) ou de radicais livres produzidos no tecido nervoso (Abadie-Guedes et al., 2008; El-Bachá et al, 1998, Netto, 1989), ou da atividade de neurotransmissores. Neste último caso, tem-se demonstrado que a ativação de diferentes sistemas de neurotransmissores cerebrais resulta em efeitos distintos sobre a DA. Esses efeitos são, em alguns casos, facilitadores e em outros, inibidores do fenômeno (para uma revisão, vide Guedes, 2011).

Estudos desenvolvidos no “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT), do Departamento de Nutrição da UFPE, têm comprovado que a susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC pode ser influenciada pelas condições em que se encontra o tecido cerebral. Dependendo dessas condições, algumas vezes o córtex pode se tornar mais vulnerável à DAC, como indicado pelas velocidades de propagação mais altas; outras vezes, mais resistente, apresentando velocidades mais baixas. Deste modo, condições de interesse clínico podem alterar essa susceptibilidade.

Fatores tais como o aumento do número de ligações sinápticas, e aumento da mielinização pode ocorrer como consequência de exercício físico. Maior número de conectividade sináptica pode aumentar a distância a ser percorrida na comunicação entre os processos celulares (Pysh et al, 1979), e este aumento da distância intercelular seria ocupado por mielina o que pode resultar no aumento da atividade do córtex motor, devido ao exercício. Considerando-se que a propagação da DAC depende em grande parte do delicado equilíbrio

eletroquímico do meio extracelular, bem como das interações neurônio-glia (Martins-Ferreira et al, 2001), não é surpreendente que a propagação da DAC fosse influenciada pela distâncias inter-neuronais e neuro-gliais, que entre outros fatores é influenciado pela quantidade de mielina entre as células corticais. Foi demonstrado que a taxa de propagação da DAC correlaciona-se inversamente com o conteúdo de mielina cortical em roedores submetidos a desmielinização cortical induzida, em que DAC foi significativamente acelerada, e em camundongos transgênicos tipo neuregulina-1, hipermielinizados, em que a propagação da DAC foi reduzida (Merkler et al, 2009). Este efeito dicotômico recebe apoio de estudos nutricionais: mostrou-se que a desnutrição de ratos jovens causa desmielinização no SNC (Almeida et al, 2005). Curiosamente, ratos desnutridos e hipernutridos no início da vida exibem, respectivamente, maiores e menores velocidades na DAC do que os animais controle bem nutridos (Rocha-de-Melo et al, 2006). Foi, portanto especulado que a mielinização deficiente e a hipermielinização podem respectivamente explicar essas observações, mas outros fatores, tais como alteração da densidade de células, proporção neurônio-glia, ou neurotransmissores sinápticos (por exemplo, o dos sistemas serotoninérgico e glutamatérgicos) tem que ser também considerados como possíveis agentes causais que merecem atenção. De fato, alterações da atividade serotoninérgica influenciam a excitabilidade cerebral (Ingelstrom & Heyward, 2012). Sabemos a partir da literatura que o exercício físico pode alterar as concentrações de triptofano no sangue em circulação, e isto aumenta a sua passagem pela barreira hematoencefálica e aumenta a produção de serotonina nos neurônios (Blomstrand, 2001). Em consonância com essa idéia, vários estudos têm demonstrado de forma inequívoca que o aumento da disponibilidade da serotonina no cérebro exerce um efeito inibitório sobre a propagação da DAC (Guedes et al, 2002; Amâncio-dos-

Santos et al, 2006), enquanto que a diminuição da atividade da serotonina acelera a DAC (Amâncio, dos-Santos et al, 2013).

Evidências experimentais indicam que o tecido nervoso apresenta naturalmente uma resistência à passagem da DAC (Guedes e Do-Carmo, 1980), e que esta resistência pode diminuir ou aumentar na vigência de alguns tratamentos, modificando assim a sua velocidade de propagação (Accioly, 2012). Variáveis nutricionais (Guedes et al., 1987; Andrade et al., 1990; Guedes et al., 1992; Rocha-de-Melo e Guedes, 1997; Rocha-de-Melo et al, 2006), hormonais (Ximenes-da-Silva e Guedes, 1991; Guedes e Pereira-da-Silva, 1993; Accioly, 2012), ambientais (Santo-Monteiro et al, 2000; Monte-Silva et al, 2007; Tenório et al, 2009; Batista-de-Oliveira et al, 2012) e farmacológicas (Guedes et al, 1987; Amâncio-dos-Santos et al, 2006; 2013) podem alterar a propagação da DAC. As Tabelas 01 e 02 apresentam diversas condições, já disponíveis na literatura, que podem dificultar ou facilitar a propagação da DAC.

Tabela 01: Algumas condições que dificultam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Tratamento dietético com lítio	Guedes et al., 1989
Hiperglicemia	Ximenes-da-Silva e Guedes, 1991; Costa-Cruz et al., 2006
Anestésicos	Guedes e Barreto, 1992
Hipotireoidismo	Guedes e Pereira-da-Silva, 1993
Envelhecimento	Guedes et al., 1996
Dieta hiperlipídica	Paixão et al., 2007
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	Guedes e 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
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 Naloxone	Guedes et al, 2013

Tabela 02: Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Redução do Cloreto extracelular	Guedes e Do Carmo, 1980
Privação do sono paradoxal	Vasconcelos et al, 2004
Diazepam	Guedes et al., 1992
Etanol	Guedes e Frade, 1993; Abadie-Guedes et al, 2012
Deficiência nutricional pela DBR*	Rocha-de-Melo e Guedes, 1997
Hipertireoidismo	Santos, 2000
Hipoglicemia	Costa-Cruz e 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. ascórbico	Monte-Guedes et al, 2011
Tratamento com o antagonista serotoninérgico Tianeptina	Amâncio-dos-Santos et al, 2013

*Dieta Básica Regional

Frente ao exposto, o presente trabalho se propôs a estudar os efeitos neurotóxicos do MSG, juntamente com as possíveis ações neurais do exercício, utilizando uma abordagem eletrofisiológica (o fenômeno da DAC) e outra imuno-histoquímica (marcação de células microgliais com anticorpo anti Iba1).

2.OBJETIVOS

Geral

Neste estudo investigou-se possíveis alterações eletrofisiológicas (DAC) e histológicas (Iba1) no cérebro de ratos em desenvolvimento, provocadas pelo tratamento precoce (durante o aleitamento) com o glutamato monossódico (MSG), associado ou não com o exercício físico.

Específicos

Nas condições dos tratamentos acima:

- Avaliar a evolução do peso corporal, como indicador do desenvolvimento do organismo;
- Na idade adulta, registrar, por um período mínimo de 4 horas, a DAC, analisando a sua velocidade de propagação, bem como a amplitude e a duração da sua variação lenta de voltagem, como indicadores de efeitos eletrofisiológicos cerebrais;
- Realizar análises imunohistoquímicas da microglia marcada com anticorpos anti Iba1 no cortex motor dos animais deste estudo;
- Comparar os efeitos do tratamento com MSG com aqueles do exercício físico e analisar a possibilidade de interação entre eles.

3.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados do presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Os efeitos neurais do MSG e do exercício físico no início da vida são determinantes importantes tanto do peso corporal quanto de alterações electrofisiológicos e microgliais no córtex cerebral.
- O córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao exercício físico em esteira tornou-se mais resistente (ou menos susceptível) à DAC; situação oposta ocorreu sob a ação do MSG.
- Electrofisiologicamente, foi caracterizado um novo efeito do MSG no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento, e foi confirmada a ação do exercício físico sobre a DAC, observada em trabalho anterior de nosso laboratório.
- Os dois fatores –MSG e exercício– apresentaram interação tanto no que se refere aos seus efeitos eletrofisiológicos, quanto ao aumento da imunoreatividade microglial (artigo 2).

Como Perspectivas,

- .- Considerando que o exercício físico pode modificar os efeitos neurotóxicos do MSG, e que também pode ter uma acção benéfica sobre o cérebro normal em desenvolvimento, propõe-se como perspectivas:
 - Dar prosseguimento à análise histoquímica referente a outros imuno-marcadores neuronais e gliais, iniciadas com os experimentos realizados durante estágio-sanduíche na Universidade Autónoma de Barcelona, sob a supervisão do professor Bernardo Castellano, Titular daquela Universidade, na vigência de bolsa concedida pela CAPES/Fundação Carolina (de outubro de 2011 a março de 2012). Esses resultados poderão originar um terceiro artigo.
 - Investigar a influência dos hormônios ovarianos nos efeitos do MSG, descritos neste trabalho. Os novos experimentos para essa investigação já estão em andamento, e são resultantes de colaboração entre mim e a doutoranda desta pós-graduação, Noranege Epifânio Accioly,

REFERÊNCIAS

- Acioy NE, Benevides RDL, Costa BLSA, Guedes RCA. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30:405-410. (2012)
- Abadie-Guedes R, Santos SD, Cahú TB, Guedes RCA, Bezerra RS. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 32: 1417-1421. (2008)
- Abadie-Guedes R, Guedes RCA, Bezerra RS. 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*, 36:1563-1567. (2012)
- Abraham R, Dougherty W, Golberg L, Coulston F. The response of the hypothalamus to high doses of monosodium glutamate in mice and monkeys. *Cytochemistry and ultrastructural study of lysosomal changes. Exp Mol Pathol*, 15:43-60. (1971)
- Almeida MF, Silveira AC, Guedes RCA. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. *Nutr Neurosci*, 8:91-99. (2005)
- Amâncio-dos-Santos A, Pinheiro PCF, Lima DSC, Ozias MG, Oliveira MB, Guimarães NX, Guedes RCA. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experimental Neurology* 200:275-282.(2006)
- Amancio-dos-Santos A, Maia LMSS, Germano PCPS, Negrão YDS, Guedes RCA. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *European Journal of Pharmacology*, 706:70-75. (2013)
- Amaral APB, Barbosa MSS, Souza VC, Ramos ILT, Guedes RCA. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. *Exp. Neur*, 219: 492-498. (2009)
- Akopian G, Walsh JP. Pre and postsynaptic contributions to age-related alterations in corticostriatal synaptic plasticity. *Synapse* 60: 223-238. (2006)
- Anish EJ. Exercise and its effects on the central nervous system . *Curr. Sports Med. Rep.* 4: 18-23. (2005)
- Andrade AFD, Guedes RCA, Teodósio NR. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition. Prevention by dietary protein supplementation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 889-893. (1990)
- Andreazzi AE, Scomparin DX, Mesquita FP, Balbo SL, Gravena C, De Oliveira JC, Rinaldi W, Garcia RMG, Grassioli S, Mathias PCF. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *J Endocrinol*, 201:351-9. (2009)
- Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *NeuroReport* 9: 3075-3079. (1999)
- Babai N, Atlasz T, Tamas A, Regl D, Toth G, Kiss P, Gabriel R. Search for the optimal monosodium glutamate treatment schedule to study the neuroprotective effects of PACAP in the retina. *Annals.*, 1070:149-155. (2006)
- Batista-de-Oliveira M, Lopes AAC, Mendes-da-Silva RF, Guedes RCA. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. *Experimental Gerontology* 47: 452-457. (2012)
- Beas-Zárate C, Rivera-Huizar SV, Martinez-Contreras A, Feria-Velasco A, Armendariz-Borunda J. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochem International* 39:1-10. (2001)

Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, Kempfski O, Stehle P, Steinhart H, Walker R. Consensus meeting: monosodium glutamate – an update. *Eur J Clin Nutr.* 61:304-313. (2007)

Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 5568-5572. (1990)

Blomstrand E. Amino acids and central fatigue. *Amino Acids*, 20:25-34. Review. (2001)

Bojanic VV, Bojanic Z, Najman S, Ivanov-eurlis J, Tomin J, Dinoic B, Savic T. Diltiazem prevention of monosodium glutamate toxicity on hypothalamus in Wistar rats. *Arch Oncol* 12:19–20. (2004)

Borba JMC, Rocha-de-Melo AP, Amâncio-dos-Santos A, Costa BLSA, Silva RP, Passos PP, Guedes RCA. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. *Nutritional Neuroscience*, 13:144-150. (2010)

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van PH, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.*, 17: 2042-2046. (2003)

Calabresi P, Centonze D, Paolo G, Marfia GA, Bernardi G. Glutamate-triggered events inducing corticostriatal long-term depression. *J Neurosci* 19:6102–6110. (1999)

Conn PJ, Pin JP,. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 205–237. (1997)

Costa-Cruz RRG, Santos AA, Guedes RCA. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neurosc. Let.*, 401, 271-275. (2006)

Costa-Cruz RRG, Guedes RCA. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. *Neurosc. Let.*, 303:177-180. (2001)

Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.*, 25: 295-301. (2002)

Cotman CW, Engesser-Cesar C. Exercise enhances and protects brain function. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 30: 75-79. (2002b)

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.*, 53: 135-159. (2001)

Dachs R. Exercise is an effective intervention in overweight and obese patients. *Am Fam Physician* 75: 1333-5. (2007)

Daniels M, Brown DR. Astrocytes regulate N-methyl-D- aspartate receptor subunit composition increasing neuronal sensitivity to excitotoxicity. *J Biol Chem.*, 276:22446–22452. (2001)

Dawson R, Annau Z A. Behavioral assessment of arcuate nucleus damage after a single injection of monosodium glutamate. *Neurobehav Toxicol Teratol.*, 5:399-406. (1983)

Dawson R JR, Wallace DR, Gabriel SM. A pharmacological analysis of food intake regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG). *Pharmacol Biochem Behav*, 32:391-8. (1989)

Dawson R, Pelleymounter MA, Millard WJ, Liu S, Eppler B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *The American Journal of Physiology*, 273: 202–206. (1997)

De Mello MA, de Souza CT, Braga LR, dos Santos JW, Ribeiro IA, Gobatto CA. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 33: 63–71. (2001)

Dobbing J. Vulnerable periods in developing brain. In: A.N. Davison and J. Dobbing, Editors, *Applied Neurochemistry*, Blackwell, Oxford, 287–316. (1968)

Dolnikoff M, Martín-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes*, 25: 426–33. (2001)

Eweka AO, Om Inibohs FAE. Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the cerebellum of adult wistar rats. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*. 2008 Volume 5 Number 1. DOI: 10.5580/1d3a. (2008)

El-Bachá RS, Lima-Filho JL, Guedes RCA. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photoactivated riboflavin. *Nut. Neurosc*, 1: 205–212. (1998)

El-Hassar L, Hagenston AM, D'Angelo LB, Yeckel MF. Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal CA1 pyramidal neuron excitability via Ca^{2+} wave-dependent activation of SK and TRPC channels. *J Physiol*. 589:3211–3229. (2011)

Eldar R, Marincek C. Physical activity for elderly persons with neurological impairment: a review, *Scand. J. Rehabil. Med*. 32: 99–103. (2000)

Fang ZH, Lee CH, Seo MK, Cho H, Lee JG, Lee BJ, Park SW, Kim YH. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. *Neurosci Res*, 9:168–0102. (2013)

Farias-Santos RC, Lira MCA, Pereira DES, Sá IR, Pimentel MRF, Araújo LL, Guedes RCA. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. *Neuroscience Letters*, 454: 218–222. (2009)

Farmer J, Zhao X, Van PH, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo, *Neuroscience*, 124: 71–79. (2004)

Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum Exp Toxicol*, 25:251–259. (2006)

Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*. 326, 483–504. (2006)

Fregni F, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Freedman S, Pascual-Leone A, Guedes RCA. Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation. *Europ. J. Neurosc*, 21: 2278–2284. (2005)

Fregni F, Liebetanz D, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Amancio-dos-Santos A, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Guedes RCA. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Exp. Neurol*, 204: 462–466. (2007)

Geha RS, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger PA, Gramme LC, Ditto AM, Harris KE, Shaughnessy MA, Yarnold PR, Corren J, Saxon A. Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 5: 973–980. (2000)

Ganong WF. Circulation through special organs. In: Review of medical physiology, cap32. McGraw-Hill, New York, 611–630. (2005)

Gill SS. Potential target sites in peripheral tissues for excitatory neurotransmission and excitotoxicity. *Toxicol Pathol.*, 28:277–284. (2000)

Goldsmith PC. Neuroglial responses to elevated glutamate in the medial basal hypothalamus of the infant mouse. *J Nutr* 130:1032S–1038S. (2000)

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J. Neurophysiol.* 88: 2187-2195. (2002)

Guedes RCA, Do Carmo RJ. Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Exp. Brain Res.*, 39: 341–349. (1980)

Guedes RCA, Andrade AFD, Cabral-Filho JE. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 20: 639-642. (1987)

Guedes RCA, Azeredo FAM, Hicks TP, Clarke RJ, Tashiro T. Opioid mechanisms involved in the slow potential change and neuronal refractoriness during cortical spreading depression. *Exp. Brain Res.*, 69: 113-118. (1987)

Guedes RCA, Silva AT, Teodósio NR, Amorim LF. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22, 923-925. (1989)

Guedes RCA, Barreto J. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25, 393-397. (1992)

Guedes RCA, Frade SF. Effect Of Ethanol On Cortical Spreading Depression. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 26:1241-1244. (1993)

Guedes RCA, Pereira-da-Silva M. Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26, 1123-1128. (1993)

Guedes RCA, Amorim LF, Teodósio NR. Effect of aging on cortical spreading depression. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1407-1412. (1996)

Guedes RCA, Cavalheiro EA. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epil Res.* 27:33-40. (1997)

Guedes RCA, Andrade AFD, Cavalheiro EA. Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: Cavalheiro EA, Lehman J, Turski L (eds) *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research*. Alan R. Liss Inc., New York. 667-670. (1988)

Guedes RCA, Santos AA, Manhães-de-Castro R, Cruz RRGC. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr. Neurosci.*, 5:115-123. (2002)

Guedes RCA. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR (eds.) *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Springer, Berlin, 2343-2355. (2011)

Guedes RCA, Rocha-de-Melo AP, Lima KR, Albuquerque JMS, Francisco ES. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. *Nutritional Neuroscience*, 16:142-146. (2013)

Hanbury R, Ling ZD, Wu J, Jeffrey K. GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults. *J Comp Neurol* 461:307–316. (2003)

Hermanussen M, Tresguerres JAF. Does high glutamate intake cause obesity? *J Pediatr Endocrinol Metabol.*, 16: 965–968. (2003a)

Hermanussen M, Tresguerres JAF. Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication? A hypothesis. *J Perinat Med.*, 31: 489–495. (2003b)

Hermanussen M, García AP, Sunder M, Voigt M, Salazar V, Tresguerres JA. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *Eur J Clin Nutr.*, Jan., 60:25-31. (2006)

Hillman CH, Belopolsky AV, Snook EM, Kramer AF, McAuley E. Physical activity and executive control: implications for increased cognitive health during older adulthood. *Res. Q. Exerc. Sport.*, 75: 176-185. (2004)

Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. Monosodium glutamate (MSG) – obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res.*, 30:671-4. (1997)

Igelström KM, Heyward PM. The antidepressant drug fluoxetine inhibits persistent sodium currents and seizure-like events. *Epil. Res.*, 101:174-181. (2012)

Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 12: 110-119. (1992)

Jiang SX, Lertvorachon J, Hou ST, Konishi Y, Webster J, Mealing G, Brunette E, Tauskela J, Preston E. Chlortetracycline and demeclocycline inhibit calpains and protect mouse neurons against glutamate toxicity and cerebral ischemia. *J Biol Chem*, 280:33811–33818. (2005)

Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 15:234-240. (2005)

Kaufhold A, Nigam PK, Dhir RN, Shapiro BH. Prevention of latently expressed CYP2C11, CYP3A2, and growth hormone defects in neonatally monosodium glutamate-treated male rats by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocilpine maleate. *J Pharmacol Exp Ther.*, 302:490-496. (2002)

Karacabey K. Effect of regular exercise on health and disease, *Neuro Endocrinol. Lett.*, 26: 617-623. (2005)

Kizer JS, Nemeroff CB, Youngblood WW. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. *Pharmacol Rev.*, 29(4):301-18. (1978)

Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260, 95–97. (1993)

Latimer CS, Searcy JL, Bridges MT, Brewer LD, Popovic J, Blalock EM, Landfield PW, Thibault O, Porter NM. Reversal of Glial and Neurovascular Markers of Unhealthy Brain Aging by Exercise in Middle-Aged Female Mice. *PLoS ONE* Volume 6 | Issue 10 | pp.1-8 e26812. (2011)

Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration, *Eur. J. Neurosci.*, 33: 1264–1274. (2011)

Leão AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, 7: 359–390. (1944)

Leão AAP. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, 10: 409-414. (1947)

Lehmenkühler A, Syková E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*. 55:339-51. (1993)

Lima DSC, Maia LMSS, Barboza EA, Duarte RA, Souza LS, Guedes RCA. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. *Life Sciences*, 85: 241-247. (2009)

Linkenhoker BA, von der Ohe CG, Knudsen EI. Anatomical traces of juvenile learning in the auditory system of adult barn owls, *Nat. Neurosci.*, 8: 93-98. (2005)

Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Davel AP, Rossoni LV, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 21:808-816. (2011)

Lopez-Perez SJ, Ureña-Guerrero ME, Morales-Villagran A. Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Res.* 1317:246-256. (2010)

Lo Turco JJ, Blanton MG, Kriegstein AR. Initial expression of endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J. Neurosci.* 11, 792–799. (1991)

Lynch G, Rex CS, Gall CM. Synaptic plasticity in early aging, *Ageing Res. Rev.*, 5: 255-280. (2006)

Maia LMSS, Amancio-dos-Santos A, Duda-de-Oliveira D, Angelim MKC, Germano PCP, Santos SF, Guedes RCA. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. *Nut. Neurosc.*, 12:73-80. (2009)

Marrannes R, Willems R, DePrins E.. Evidence for a role of the NMDA receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res.*, 457:226–240. (1988)

Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C. Perspectives on spreading depression. *Brain Res Rev.*, 32:215–234. (2000)

Martinsen EW. Physical activity in the prevention and treatment of anxiety and depression, *Nord. J. Psychiatry* 62 Suppl., 47: 25-29. (2008)

Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 1144:97–112. (2008)

McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res.*, 15: 41–70. (1990)

Miranda RA, Branco RC, Gravena C, Barella LF, da Silva Franco CC, Andreazzi AE, de Oliveira JC, Picinato MC, de Freitas Mathias PC. Swim training of monosodium L-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. *Endocrine*, 43:571-578. (2013)

Monte-Guedes CKR, Alves EVS, Viana-da-Silva E, Guedes RCA. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. *Neuroscience Letters* 496:191–194. (2011)

Monte-Silva KK, Assis FLN, Leal GMA, Guedes RCA. Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain development on cortical spreading depression in weaned rats. *Nutritional Neuroscience*, 10: 187–194. (2007)

Montesi L, Moscatiello S, Malavolti M, Marzocchi R, Marchesini G. Physical activity for the prevention and treatment of metabolic disorders. *Internal and Emergency Medicine*. May 9, pgs 1-12, DOI 10.1007/s11739-013-0953-7. (2013)

Moraes-Silva IC, Mostarda C, Moreira ED, Silva KA, dos Santos F, de Angelis K, Farah V M, Irigoyen MC. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. *J Appl Physiol.*, 114:786-91. (2013)

- Morgane PJ, Austin-La France R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 17: 91-128. (1993)
- Moura LP, Sponton AC, de Araújo MB, Dalia RA, Pauli JR, Rostom de Mello MA. Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats. *Lipids Health Dis.* 6:12-29. (2013)
- Musa M, Sunday AM. Clumping of the Nuclei Material of Pyramidal Cells of Adult Wistar Rats Following Oral Administration of Monosodium Glutamate. *Research and Reviews: Journal of Medical and Health Sciences.*, 2319–9865. (2013)
- Nakanishi Y, Fujimoto KM, Salunga TL, Nomoto K, Nakano M, Selmi C, Gershwin M. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *J Autoimmun.* 30:242–250. (2008)
- Nascimento-Curi CMO, Marmo RR, Egami M, Ribeiro EB, Andrade IS, Dolnikoff MS. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis and lipoprotein lipase activity in adult rats. *Biochem Int.* 24: 927-935. (1991)
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 373-109. (1995)
- Netto M, Martins-Ferreira H. Elicitation of spreading depression by rose bengal photodynamic action. *Photochem. Photobiol.*, 50: 229-234. (1989)
- O'Connor R, Finger BC, Flor PJ, Cryan JF. Metabotropic glutamate receptor 7: At the interface of cognition and emotion. *European Journal of Pharmacology*, 639:123–131. (2010)
- Ozmerdivenli R, Bulut S, Bayar H, Karacabey K, Ciloglu F, Peker I, Tan U.. Effects of exercise on visual evoked potentials. *Int J Neurosci.*, 115:1043-1050. (2005)
- Paixão ADO, Trindade AS, Dantas AC, Barreto ISS, Vieira-Filho LD, Medeiros MC, Teodósio NR, Guedes RCA. 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., 13:239-263. (2007)
- Park JH, Yoo KY, Lee CH, Kim IH, Shin BN, Choi JH, Hwang IK, Won MH. Comparison of glucocorticoid receptor and ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity in the adult and aged gerbil hippocampus following repeated restraint stress. *Neurochem Res.*, 36:1037–1045. (2011)
- Peixinho-Pena LF, Fernandes J, de Almeida AA, Novaes Gomes FG, Cassilhas R, Venancio DP, de Mello MT, Scorza FA, Cavalheiro EA, Arida RM. A strength exercise program in rats with epilepsy is protective against seizures. *Epilepsy Behav.*, 25:323-8. (2012)
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.*, 20:464-70. (1997)
- Pereira Lo, Francischi Rp, Lancha Jr Ah. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, 47:111-27. (2003)
- Pysh JJ, Weiss, G.M. Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. *Science*, 206:230-2. (1979)
- Rocha-de-Melo AP, Guedes RCA. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition within the lactation period. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 663-670. (1997)
- Rocha-de-Melo AP, Cavalcante JB, Barros SA, Guedes RCA. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutritional Neuroscience*, 9: 155–160. (2006)

- Rothman SM, Mattson MP. Activity-Dependent, Stress-Responsive Bdnf Signaling And The Quest For Optimal Brain Health And Resilience Throughout The Lifespan. *Neuroscience*, 239; 228–240. (2013)
- Ruiz-Larrea MB et al. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radical Research*, 26:63-70. (1997)
- Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, Ghabaee M, Gorji A. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. *Exp Neurol.*, 233:438-446. (2012)
- Santos-Monteiro JS, Teodósio NRT, Guedes RCA. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. *Nut. Neurosc.*, 3, 29-40. (2000)
- Shen H, Tong L, Balazs R, Cotman CW. Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience*.107:219-29. (2001)
- Siesjö BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 9:127–140. (1989)
- Smith AD, Zigmond MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism, *Exp. Neurol.*, 184: 31-39. (2003)
- Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Iimura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS, Nishijima T. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358: 961-967. (2007)
- Stafstrom CE. The role of glutamate transporters in develop- mental epilepsy: a concept in flux. *Epilepsy Curr.*, 4:243–244. (2004)
- Stagg CJ, Bestmann S, Constantinescu AO, Moreno LM, Allman C, Mekle R, Woolrich M, Near J, Johansen-Berg H, Rothwell JC. Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol.*, 589:5845-5855. (2011)
- Sun YM, Hsu HK, Lue SI, Peng MT. Sex-specific impairment in sexual and ingestive behaviors of monosodium glutamate-treated rats. *Physiol Behav.*, 50:873-880. (1991)
- Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, Konda S, Engberg K, Lauterbur PC, Greenough WT. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat, *Neuroscience*, 117: 1037-1046. (2003)
- Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, Schoepp DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat. Rev.*, 4, 131–144. (2005)
- Tenório AS, Oliveira IDVA, Guedes RCA. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. *Int. J. Devel. Neurosci.*, 27, 431–437. (2009)
- Tokuyama K, Himms-Hagen H. Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate-treated mice. *Am J Physiol.*, 251: E407-15. (1986)
- Vinodini N, Nayanatara AK, Gowda KM, Ahamed B, Ramaswamy C, Bhat RM. Effect of monosodium glutamate-induced oxidative damage on rat testis. *J Chin Clin Med.*, 3:370–373. (2008)
- Tong L. et al. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis [S.I.]*, v. 8, n. 6, p. 1046-56. (2001)

Torres LM, Cefaratti C, Perry B, Romani A. Involvement of ERK1/2 and p38 in Mg^{2+} accumulation in liver cells. *Mol Cell Biochem.*, 288:191-99. (2006)

Trindade-Filho EM, Vasconcelos CAC, Guedes RCA. Tryptophan administration acutely impairs cortical spreading depression propagation in REM-sleep-deprived and non-deprived adult rats. *Psychology and Neuroscience* 2:235-241. (2009)

Ureña-Guerrero ME, López-Pérez SJ, Beas-Zárate C. Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. *Neurochem Int.*, 42:269–276. (2003)

Ureña-Guerrero ME, Orozco-Suárez S, López-Pérez SJ, Flores-Soto ME, Beas-Zárate C. Excitotoxic neonatal damage induced by monosodium glutamate reduces several GABAergic markers in the cerebral cortex and hippocampus in adulthood. *Int. J. Devl Neurosci.*, 27:845–855. (2009)

Van PH, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96: 13427-13431. (1999)

Van PH, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nat. Neurosci.*, 2: 266-270. (1999)

Van PH, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, *J. Neurosci.*, 25: 8680-8685. (2005)

Vasconcelos CAC, Oliveira JAF, Costa LAO, Guedes RCA. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. *Nut. Neurosc.*, 7:163-170. (2004)

Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields, *J. Neurosci. Res.*, 76: 356-362. (2004)

Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition, *Eur. J. Neurosci.*, 20: 2580-2590. (2004)

Viana LC, Lima CM, Oliveira MA, Borges RP, Cardoso TT, Almeida INF, Diniz DG, Bento-Torres J, Pereira A, Batista-de-Oliveira M, Lopes AAC, Silva RFM, Abadie-Guedes R, Amâncio-dos-Santos A, Lima DSC, Vasconcelos PFC, Cunningham C, Guedes RCA, Picanco-Diniz CW. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. *Neuroscience*. 238:280–296. (2013)

Walker R, Lupien JR. The safety evaluation of monosodium glutamate. *J. Nutr.*, 130:1049–1052. (2000)

Xia Y, Ragan RE, Seah EE, Micahelis ML, Michaelis EK. Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced neurotoxicity, NMDA receptor function, and NMDAR1 and glutamate binding protein subunits in cerebellar granule cells in primary cultures. *Neurochem. Res.*, 20: 617–629. (1995)

Ximenes-da-Silva A, Guedes RCA. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24: 1277-1281. (1991)

Zhang WM, Kuchar S, Mozes S. Body fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Brain Res Bull.*, 35:383-85. (1994)

Zhang Y, Zhang P, Shen X, Tian S, Wu Y, Zhu Y, Jia J, Wu J, Hu H. Early Exercise Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemic Brain Injury via the Regulation of MMP-9 and Occludin in Rats. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 11096-11112. (2013)

Zhong J, Gribkoff VK, Mollinoff PB. Use of subunit-specific antisense oligodesoxynucleotides to define developmental changes in the properties of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.*, 50: 631–638. (1996)



ARTIGO CIENTÍFICO 1
(ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)

Title: Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex

Authors: Cássia Borges Lima¹, Geórgia de Sousa Ferreira Soares¹, Suênia Marcelle Vitor¹, Bernardo Castellano², Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa³, Rubem Carlos Araújo Guedes^{1*}.

Address: ¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Unit of Medical Histology, Autonomous University of Barcelona, Spain.

³Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife

* Corresponding author (address: Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil).

E-mails: rguedes@ufpe.br and guedes.rca@gmail.com

Phone: +55-81-21268936

Fax: +55-81-21268473

Abstract

Aims: Monosodium glutamate (MSG) is a neuroexcitatory amino acid used in human food to enhance flavor. MSG can affect the morphological and electrophysiological organization of the brain. This effect is more severe during brain development. Here, we investigated the electrophysiological and morphological effects of MSG in the developing rat brain by characterizing changes in the excitability-related phenomenon of cortical spreading depression (CSD) and microglial reaction.

Main methods: From postnatal days 1-14, Wistar rat pups received 2 or 4 g/kg MSG (respectively groups MSG-2 and MSG-4; $n=9$ in each group), saline ($n=10$), or no treatment (naïve group; $n=5$) every other day. At 45-60 days, CSD was recorded on two cortical points for 4h. The CSD parameters velocity, and amplitude and duration of the negative potential change were calculated. Fixative-perfused brain sections were immunolabeled with anti-IBA-1 antibodies to identify and quantify cortical microglia.

Key findings: MSG-4 rats presented significantly higher velocities (4.59 ± 0.34 mm/min) than the controls (saline, 3.84 ± 0.20 mm/min; naïve, 3.71 ± 0.8 mm/min) and MSG-2 group (3.75 ± 0.10 mm/min). The amplitude (8.8 ± 2.2 to 11.2 ± 1.9 mV) and duration (58.2 ± 7.1 to 73.6 ± 6.0 s) of the negative slow potential shift was similar in all groups. MSG-treatment dose-dependently increased the microglial immunolabeling.

Significance: The results demonstrate a novel, dose-dependent action of MSG in the developing brain, characterized by acceleration of CSD and significant microglial reaction in the cerebral cortex. The CSD effect indicates that MSG can influence cortical excitability,

during brain development, as evaluated by CSD acceleration. Data suggest caution when consuming MSG, especially in developing organisms.

Key words: Food flavoring agent; Brain development; Brain electrophysiology; Glutamatergic system; Rat

1. Introduction

The increased incidence of obesity in modern society appears to be a consequence of the association between organic factors (genetic and hormonal predisposition) and several exogenous factors, including overconsumption of a fat-rich diet and a sedentary lifestyle, facilitated by the excessive use of modern electronic media that reduce daily physical activity, such as remote controls and electronic games. The fact that the incidence of obesity is also increasing in childhood is of great concern (Dachs, 2007).

In the last decade, a new and challenging hypothesis has linked obesity, hyperphagia, and growth hormone (GH) deficiency to the consumption of elevated amounts of the amino acid glutamate (GLU) (Hermanussen and Tresguerres, 2003a, b). Supraphysiological doses of GLU are toxic to neuronal cells (Hermanussen and Tresguerres, 2005). A broadly used model for studying this issue in experimental animals consists of treating the animals with repeated subcutaneous administration of monosodium glutamate (MSG). MSG is a neuroexcitatory amino acid used as a flavoring agent; it can be harmful to the central nervous system if consumed in great amounts (Nemeroff et al, 1978). Brain lesions and obesity have been reported in adult mice and monkeys previously treated with MSG early in life (Abraham et al, 1971).

During nervous system development, the activation of glutamate receptors may play important roles in naturally occurring neuron death, as well as various neurodegenerative disorders. Over-activation of the glutamate ionotropic receptors leads to excitotoxic cell death and can induce apoptosis or necrosis depending on the intensity of receptor activation (Johnston, 2005). These alterations likely influence electrical

activity in the brain (Sadeghian et al, 2012). Therefore, we investigated the effect of previous treatment with MSG on the electrophysiological phenomenon known as “cortical spreading depression” (CSD) in the brains of weaned young rats.

CSD has been characterized electrophysiologically in laboratory animals (Leão, 1944; 1947) and humans (Dohmen et al, 2008; Fabricius et al, 2008) as a fully reversible response of the cerebral cortex. In animals, CSD can be produced by electrical, mechanical, or chemical stimulation of one point of the tissue, and then spread concentrically to remote cortical regions (Leão, 1944; Gorji, 2001). This response propagates slowly as a “wave” of reduced cortical electrical activity. The neural tissue normally offers resistance to CSD propagation. This resistance can be increased or decreased by experimental manipulations, resulting in lower or higher propagation velocity, respectively (Guedes, 2011; Rocha-de-Melo et al, 2006). Measuring the velocity of CSD propagation along the cortical tissue is a reasonable and simple method for estimating susceptibility of the brain to CSD under clinically relevant conditions known to influence brain excitability (Amaral et al, 2009). Experimental conditions that facilitate or impair the brain's ability to produce and propagate CSD may be helpful to understanding the electrophysiological processes dependent on brain excitability and related diseases, such as epilepsy (Leão, 1944; Guedes and Cavalheiro, 1997; Guedes et al, 2009; Leão, 1972).

The present study aimed to investigate possible electrophysiological changes in the developing brain, caused by treatment with MSG, as indicated by CSD propagation in rats. We postulated that the susceptibility of the brain to CSD would be altered in weaned young rats that are treated early in life with MSG. In addition, we examined

how early administration of MSG affects microglial cells by analyzing IBA1-immunolabeled cells in the motor area of the cerebral cortex.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Male Wistar rat pups received 2 g/kg or 4 g/kg MSG (MSG-2 and MSG-4, respectively; n=9 for each group) subcutaneously every other day during the first 14 days of life. The groups were compared to two control groups: one injected with saline (group Sal; n = 10) and one that did not receive any injection (naïve group; n = 5). After weaning, the pups were housed in polypropylene cages (51 cm × 35.5 cm × 18.5 cm; 3-4 per cage) in a room maintained at $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 7 a.m.) and fed a lab chow diet with 23% protein (Purina do Brazil Ltd.). The animals were handled in accordance with the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

2.2 Body weight

Body weight was measured on postnatal days 2, 10, and 45-50.

2.3 CSD recording

When the animals were 45 to 60 days old, they were submitted to CSD recording for a 4-hour period. Under anesthesia (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, ip), the rat's head

was secured in a stereotaxic apparatus (Kopf, USA) and three trephine holes (2–3 mm in diameter) drilled on the right side of the skull (two at the parietal bone and one at the frontal bone). The three holes were aligned in the anteroposterior direction and parallel to the midline.

CSD was elicited at 20 min intervals by applying a cotton ball (1–2 mm diameter) soaked in 2% KCl solution (approximately 0.27 M) to the anterior hole drilled at the frontal region for 1 min. The electrocorticogram (ECoG) and slow direct current (DC) potential change accompanying CSD were recorded simultaneously at the two parietal points on the cortical surface using a pair of Ag-AgCl agar-Ringer electrodes. The electrodes consisted of plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter) filled with Ringer solution and solidified with the addition of 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. The pipettes were fixed in pairs with cyanoacrylate glue so that the interelectrode distance was constant for each pair (4–5.5 mm). Each pair of electrodes was fixed to the electrode holder of the stereotaxic apparatus so that the recording electrodes could be placed gently on the intact dura-mater under the guidance of a low-power microscope without any excessive pressure on the cortical surface. A common reference electrode of the same type was placed on the nasal bones. The velocity of CSD propagation was calculated based on the time required for a CSD wave to cross the distance between the two recording electrodes. The initial point of each negative rising phase was used as the reference point for the measurement of CSD velocities. During the recording session, rectal temperature was maintained at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ by a heating blanket. After the recording session was terminated, the anesthetized animal was submitted to euthanasia by bulbar injury, which was carried out by introducing a sharp needle into the cisterna magna, provoking immediate cardio-respiratory arrest.

2.4 Duration and amplitude of slow potential shifts

For all CSD episodes, we calculated the amplitude and duration of the negative slow potential shifts of the CSD waves recorded in the two cortical points: 1 and 2 (see inset in Fig. 2).

2.5 Analysis of immunolabeled microglial cells

An additional group of 12 rats treated with saline (n=4), MSG-2 (n=3) and MSG-4 (n=5) were perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde diluted in 0.1M phosphate-buffered saline, pH7.4. The brains were removed and immersed in the fixative during 4 h and thereafter transferred to a 30% (w/v) sucrose for cryoprotection. Longitudinal serial sections (40- μ m thickness) were obtained at -20°C with a cryoslicer (Leica 1850). Sections were immunolabeled with a polyclonal antibody against the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) to detect microglia (anti-IBA-1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). All chemicals used in this investigation were supplied by Vector Labs (Burlingame, CA, USA) or Sigma-Aldrich (Poole, UK). Free-floating sections were submitted to endogenous peroxidase blocking (2% H₂O₂ in 70% methanol for 10 min); then, sections were incubated for 1 h in Blocking Buffer solution (BB) containing 0.05 M Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4, 10% fetal calf serum, 3% bovine serum albumin and 1% Triton X-100. Afterwards, sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-Iba-1 (1:1,500 diluted in BB solution). After washes with TBS+ 1% Triton, sections were incubated at room temperature for 1 h with biotinylated anti-rabbit (1:500) secondary antibodies. Sections were then rinsed in TBS+ 1% Triton and incubated with horseradish peroxidase streptavidin (1:500). The peroxidase reaction was visualized by

incubating the sections in Tris buffer containing 0.5 mg/ml 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.33 μ l/ml H₂O₂. Finally, sections were mounted, dehydrated in graded alcohols and after xylene treatment coverslipped in Entellan®. For each animal, densitometric analysis was performed on four parallel longitudinal sections. In each section, we analyzed photomicrographs of four fields within the motor cortex (layer 5) using the software Image J. A Leica DMLS microscope coupled to SAMSUNG high level color camera (model SHC-410NAD) was used to obtain digital images from brain sections. Images from the motor cortex immunoreacted for Iba1 were obtained with a 20 $\times$ microscope objective. Care was taken to obtain the digital images using the same light intensity conditions. We analyzed the area occupied by the Iba1-labeled cells, as well as the immunoreactivity expressed as arbitrary units.

2.6 Statistical analysis

Intergroup differences were compared by ANOVA, followed by a post hoc (Tukey–Kramer) test when indicated. Statistical analyses were performed using Sigmastat® version 3.10. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Body weight

As illustrated in Fig. 1, MSG treatment was associated with a dose-dependent reduction in body weight at 45-50 days of age. The difference was significant ($P<0.05$) in the group treated with the higher MSG dose (MSG-4) compared to the control rats.

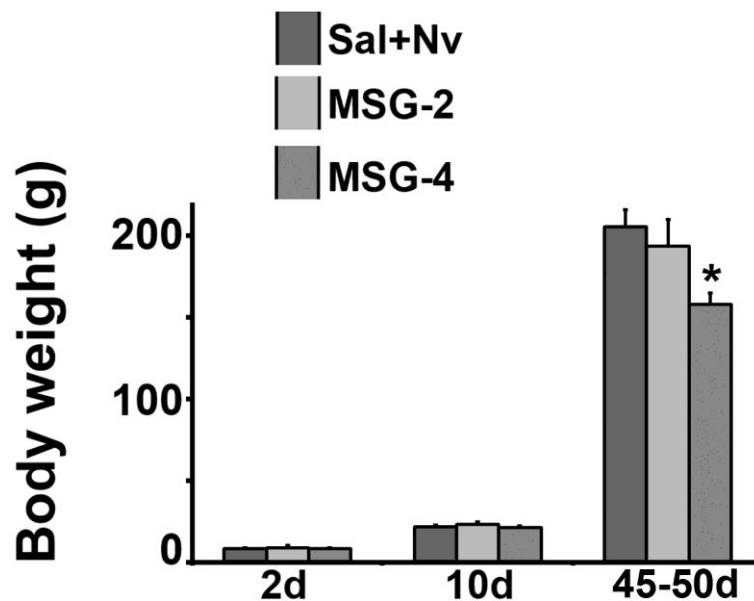


Fig. 1. Body weights of rats at 2, 10, and 45-50 days of life. Sal, saline; Nv, naïve, or no treatment; MSG-2, 2 g/kg subcutaneous MSG; MSG-4, 4 g/kg subcutaneous MSG. * $P<0.05$ compared to control, ANOVA plus Tukey test. Data are mean $\pm$ S.E.M. Groups Sal and Nv were pooled, as their weights were similar.

3.2 Velocity of CSD propagation

Figure 2 shows representative electrophysiological recordings (slow DC potential change and ECoG) in one MSG 4, one Sal, and one naïve rat. In all groups, 1-min stimulation with 2% KCl at one point of the 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 (see stimulation and recording-points in the inset of Fig. 2). In each recording point, the ECoG depression and slow potential change confirmed the presence of CSD after KCl application. As a rule, recovery of the electrophysiological changes caused by CSD took approximately 5 to 10 min, and we maintained a 20-min interval between subsequent stimulations with KCl.

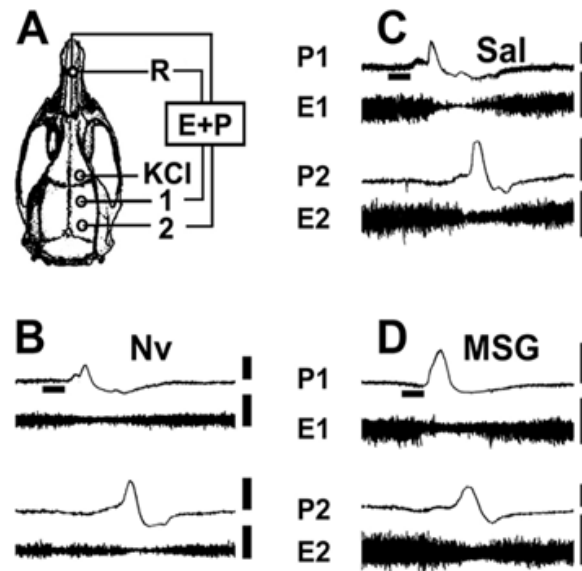


Fig. 2. A- Diagram of the rat skull showing the location of KCl application, the reference electrode and the recording points 1 and 2 (at which the traces in B to D marked with the same numbers were recorded). B to D- Electrocorticogram (E) and slow potential change (P) recorded during cortical spreading depression (CSD) in three 45-50 day-old rats from the untreated group (Nv), saline (Sal) group, and group treated with 4 g/kg monosodium glutamate (MSG-4). The horizontal bars in P1 show the period (1 min) of stimulation with 2% KCl necessary to elicit CSD. The vertical bars equal -10 mV and -1 mV, respectively, for P and E (negativity is upwards).

Figure 3 presents the CSD propagation velocities calculated for all groups. Treatment with 4 g/kg MSG early in life resulted in significantly higher CSD velocities (4.59 ± 0.34 mm/min) compared to the two control groups (saline: 3.84 ± 0.20 mm/min; naïve: 3.71 ± 0.8 mm/min). The MSG-2 group had a mean velocity of 3.75 ± 0.10 mm/min.

3.3 Duration and amplitude of CSD waves

The amplitude and duration of the negative slow potential wave, which is the hallmark of CSD, were measured at the two recording points (point 1 and point 2). ANOVA revealed no significant intergroup difference. The mean amplitudes (in mV) for the controls, MSG-2 and MSG-4 groups were respectively 8.8 ± 2.2 , 9.0 ± 3.8 and 10.7 ± 3.0 for point 1, and 11.1 ± 3.9 , 10.0 ± 1.5 and 11.2 ± 1.9 for point 2. The durations (in s) for the controls, MSG-2 and MSG-4 groups were respectively 62.6 ± 10.3 , 58.6 ± 7.7 and 58.2 ± 7.1 for point 1, and 73.6 ± 6.0 , 63.6 ± 10.4 and 68.8 ± 7.6 for point 2. Data are presented in Table 1.

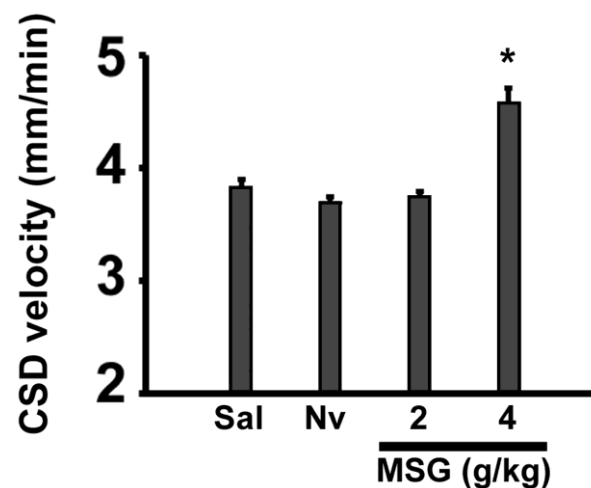


Fig. 3. Velocities of CSD propagation in 45-60 day-old rats that received previous (during the lactation period) saline (Sal), no treatment (naïve group; Nv), or 2 g/kg and 4 g/kg MSG

(subcutaneous injections; MSG-2 and MSG-4, respectively). Data are mean $\pm$ S.E.M. of 12 CSD episodes elicited at 20-min intervals by 1-min KCl application during the 4h recording period. * $P<0.05$ compared to the other groups, ANOVA plus Tukey test.

Table 1 Amplitude and duration of the negative slow potential shifts of cortical spreading depression in rats treated with MSG.

Groups	CSD amplitude (mV)		CSD duration (s)	
	Point 1	Point 2	Point 1	Point 2
Saline + Naïve (n=10)	8.8 $\pm$ 2.2	11.1 $\pm$ 3.9	62.6 $\pm$ 10.3	73.6 $\pm$ 6.0
MSG-2 (n=8)	9.0 $\pm$ 3.8	10.0 $\pm$ 1.5	58.6 $\pm$ 7.7	63.6 $\pm$ 10.4
MSG-4 (n=7)	10.7 $\pm$ 3.0	11.2 $\pm$ 1.9	58.2 $\pm$ 7.1	68.8 $\pm$ 7.6

MSG-2, 2 g/kg; MSG-4, 4 g/kg. The treatment groups were compared to control groups treated with saline or no treatment (naïve). The two control groups were pooled, as they did not differ. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. No significant differences were observed.

3.4 Iba1 immunohistochemistry and densitometric analysis

The specific immunolabeling of the calcium-binding protein Iba1 in the microglial cells enables the analysis of microglial distribution in the cerebral cortex without the interference of the cortical blood vessels (Fig. 4-A). Compared to the controls, MSG-treated animals presented higher percentage of labeled area (Fig. 4-B), and a higher immunoreactivity as expressed in arbitrary units (Fig. 4-C). This MSG effect was directly dependent on the MSG dose, with the highest effect seen in the MSG-4 group.

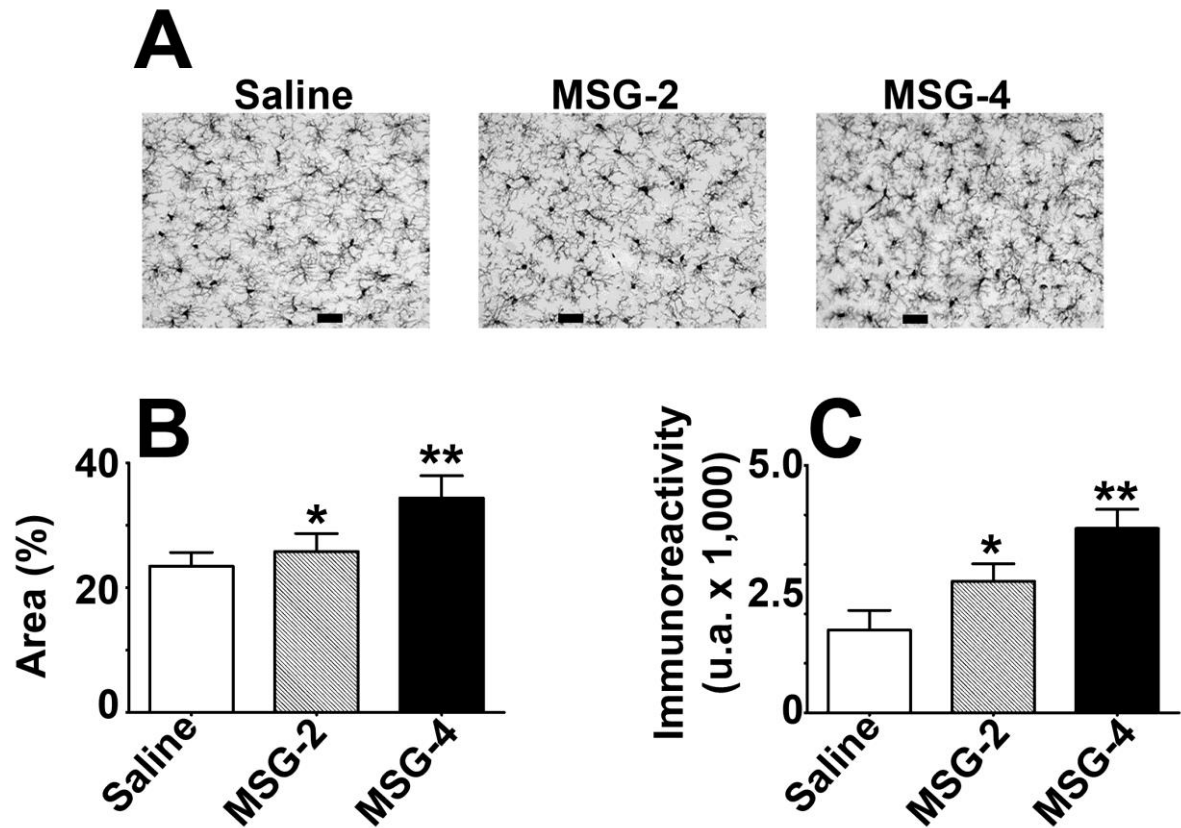


Fig. 4. A- Digital images of Iba1-immunolabeled microglial cells in longitudinal sections through the motor cortex of three rats treated respectively with saline, 2g/kg MSG and 4g/kg MSG. Note the darker labeling in the MSG-4 group. Scale bars = 20 μ m. B- Percent area occupied by the Iba1-labeled cells. C- Immunoreactivity expressed as arbitrary units (a.u.). Data are expressed as means $\pm$ standard deviations. * P <0.05 compared to the saline group. ** P <0.05 compared to the Saline and MSG-2 groups.

4. Discussion

Our data suggested that the neural effects of MSG treatment early in life are important determinants of body weight, and documented electrophysiological and microglial alterations in the cerebral cortex. The body weight changes associated with MSG treatment confirmed

previous findings (Sun et al, 1991; Zhang et al, 1994; Lobato et al, 2011). Electrophysiologically, we characterized a novel effect of MSG in the developing rat brain.

Our main finding was that 4 g/kg, but not 2 g/kg, MSG treatment early in life increased the brain's ability to propagate CSD when the animals reached 45-60 days of age, as indicated by higher CSD velocities compared to the velocities of the controls. As MSG treatment occurred early in life and CSD acceleration, as well as the microglial reaction was observed after weaning, we postulate that these effects of MSG are permanent, or at least long lasting. In neonatal rats, MSG can cause structural, neuroendocrine, and biochemical abnormalities (Zhang et al, 1994; Olney, 1969; Beas-Zarate et al, 2001; González-Burgos et al, 2001), which raises the question of whether the MSG-induced electrophysiological changes are caused by an MSG-induced brain lesion or the expression of compensatory mechanisms against such lesion, as previously suggested (Ureña-Guerrero et al, 2003).

The central nervous system is an important target organ for the actions of MSG, particularly during brain development. Brain maturation in the rat occurs mainly during the lactation period, a stage in which synaptogenesis is intense, corresponding to the synaptogenic period in the human brain, approximately the first year of life (Dobbing, 1968; Morgane et al, 1978). The relevance of our data for human brain function is based on the fact that a growing part of the human population consumes MSG as a food flavoring, including children. In European and Asian countries, the increasing consumption of MSG is a matter of great concern (Beyreuther et al, 2007), not only due to the increased risk of obesity, but also due to the neurotoxic effects that can occur with high consumption of MSG.

The glutamatergic system has been shown to be involved in the regulation of brain excitability in both humans (Stagg et al, 2011) and laboratory animals (El-Hassar et al, 2011).

Interestingly, Lopez-Perez and her colleagues recently demonstrated that MSG-treated rat pups have altered EEG and behavioral reactions, suggesting seizure initiation (Lopez-Perez et al, 2010). In line with this evidence, we observed facilitation of CSD propagation in the group treated with 4g/kg MSG. This is important to the present discussion because of the postulated relationship between CSD and excitability-related neurological disorders like epilepsy (Guedes et al, 1988; Guedes and Cavalheiro, 1997) and migraine (Vecchia and Pietrobon, 2012).

The mechanisms by which MSG exerts its actions on the nervous system are not yet fully clarified. Hermanussen and Tresguerres (2005) showed increases in GLU levels and the activation of GLU receptors after neonatal administration of 4 mg MSG/g body weight. They also reported important changes in NMDA-R molecular composition with signs of neuronal damage, and an increase in glial cell reactivity. This last effect is in line with our immunohistochemical data that showed increased microglial reaction in the cerebral cortex. It is interesting to note that Iba1-positive microglial cells have been shown to increase in the hippocampus under stressful conditions such as restraint (Park et al, 2011) and aging (Viana et al, 2013).

On the other hand, Kaufhold and colleagues (2002) were able to prevent the adverse effects of neonatal MSG treatment with concurrent administration of a selective and highly potent noncompetitive NMDA-R antagonist, dizocilpine maleate. In general, MSG has been demonstrated to modulate brain excitability (Lopez-Perez et al, 2010), a process that could influence phenomena such as seizures and CSD (Guedes and Cavalheiro, 1997). Effects on neurotoxicity via the p38 pathway (Torres et al, 2006) or increasing brain glutamate levels after MSG treatment (Lopez-Perez et al, 2010) have been discussed but still require corroboration based on robust experimental evidence. However one cannot exclude the

possibility that MSG administration during the postnatal critical period of brain development could also influence other neurotransmitter systems, e.g., the GABAergic system (Ureña-Guerrero et al, 2003; 2009). Furthermore, during development glutamate may also exert a neurotrophic function, positively influencing neuronal differentiation and circuitry formation (McDonald et al 1990). This can be relevant for excitability-related phenomena such as CSD.

Although the mechanisms by which MSG accelerates CSD propagation are not yet known, we can speculate based on CSD experiments involving mechanisms that are also proposed as being involved in neural MSG actions. Interestingly, changes in the p38 pathway have been reported in animals with seizures induced by manipulation of the glutamatergic system (Che et al, 2001). In addition, the accumulation of reactive oxygen species and subsequent release of nitric oxide have been described as a consequence of glutamatergic stimulation (Kostandy, 2012). Such neurotoxic effects seem to be counteracted by the antioxidant molecule ascorbic acid (Hashem et al, 2012), suggesting that the antioxidants potentially exert neuroprotective actions against MSG-induced oxidative stress (Farombi and Onyema, 2006). Notably, all of these mechanisms are known to influence CSD, as demonstrated previously by our laboratory (Guedes et al, 1988; Maia et al, 2009; Monte-Guedes et al, 2011) and by others (Marranes et al, 1988; Viggiano et al, 2008).

In conclusion, we demonstrated for the first time that the brains of weaned rats treated with MSG during their development are more susceptible (or less resistant) to CSD propagation, without altering other electrophysiological CSD parameters, particularly the amplitude and duration of the negative DC potential typical of the phenomenon. The immunohistochemical data revealed that MSG also induced microglial reaction in the cerebral cortex. We suggest that these MSG actions are related to its excitability effects via synaptic glutamatergic transmission, which ultimately modulates brain excitability. Our findings stress

the importance of searching for the molecular mechanisms underlying the actions of MSG in brain development and their electrophysiological expression. As CSD is an energy-demanding phenomenon that involves glutamate, ATP and glucose (Costa-Cruz et al, 2006), and its occurrence involves neuron-glia interaction, we think that the present findings can also be useful for further understanding the CSD underlying mechanisms.

Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Procad no. 131/2007), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe—IBPG no. 0085-2.07/09), 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 from CNPq (no. 301190/2010-0).

Conflict of interests: None

Reference List (Artigo 1)

1. Abraham R, Dougherty W, Golberg L, Coulston F. The response of the hypothalamus to high doses of monosodium glutamate in mice and monkeys. Cytochemistry and ultrastructural study of lysosomal changes. *Exp Mol Pathol* 1971; 15:43-60.
2. Amaral AP, Barbosa MS, Souza VC, Ramos IL, Guedes RCA. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. *Exp Neurol* 2009; 219:492-8.
3. Beas-Zarate C, Rivera-Huizar SV, Martinez-Contreras A, Feria-Velasco A, Armendariz-Borunda J. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochem Internat* 2001; 39:1-10.
4. Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, Kempinski O, Stehle P, Steinhart H, Walker R. Consensus meeting: monosodium glutamate – an update. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61:304-313.
5. Che Y, Yu YM, Han PL, Lee JK. Delayed induction of p38 MAPKs in reactive astrocytes in the brain of mice after KA-induced seizure. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 94:157-165.
6. Costa-Cruz RRG, Amancio-dos-Santos A, Guedes RCA. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. *Neuroscience Letters* 2006; 401:271–275.
7. Dachs R. Exercise is an effective intervention in overweight and obese patients. *Am Fam Physician* 2007; 75:1333-35.

8. Dobbing J. The development of the blood-brain barrier. *Progr Brain Res* 1968; 29:417-427.
9. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 2008; 63:720-28.
10. El-Hassar L, Hagenston AM, D'Angelo LB, Yeckel MF. Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal CA1 pyramidal neuron excitability via $\text{Ca}^{(2)(+)}$ wave-dependent activation of SK and TRPC channels. *J Physiol* 2011; 589:3211-3229.
11. Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M. Association of seizures with cortical spreading depression and peri infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol* 2008; 119:1973-1984.
12. Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum Exp Toxicol* 2006; 25:251-59.
13. Gonzalez-Burgos I, Perez-Vega MI, Beas-Zarate C. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 2001; 297:69-72.
14. Gorji. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev* 2001; 38:33-60.
15. Guedes RCA, Andrade AFD, Cavalheiro EA. Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: Cavalheiro EA, Lehman J, Turski L (eds) *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research*. Alan R. Liss Inc., New York 1988; 667-670.

16. Guedes RCA, Cavalheiro EA. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epil Res* 1997; 27:33-40.
17. Guedes RCA, Oliveira JA, Amancio-dos-Santos A, Garcia-Cairasco N. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). *Epil Res* 2009; 83:207-214.
18. Guedes RCA. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR (eds.) *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Springer, Berlin 2011; 2343-2355.
19. Hashem HE, El-Din Safwat MD, Algaidi S. The effect of monosodium glutamate on the cerebellar cortex of male albino rats and the protective role of vitamin C (histological and immunohistochemical study). *J Mol Histol* 2012; 43:179-186.
20. Hermanussen M, Tresguerres JA. Does high glutamate intake cause obesity? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003a; 16:965-68.
21. Hermanussen M, Tresguerres JA. Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication? A hypothesis. *J Perinat Med* 2003b; 31:489-495.
22. Hermanussen M, Tresguerres JA. How much glutamate is toxic in paediatric parenteral nutrition? *Acta Paediatr* 2005; 94:16-9.
23. Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol* 2005; 15:234-240.
24. Kaufhold A, Nigam PK, Dhir RN, Shapiro BH. Prevention of latently expressed CYP2C11, CYP3A2, and growth hormone defects in neonatally monosodium glutamate-treated male rats by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocilpine maleate. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:490-496.
25. Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci* 2012; 33:223-37.

26. Leão AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944; 7:359–390.
27. Leão AAP. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1947; 10:409-414.
28. Leão AAP. Spreading depression. In: Purpura DP, Penry K, Tower DB, Woodbury DM, Walter RD (eds.) *Experimental Models of Epilepsy*. Raven Press, New York 1972; 173–195.
29. Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Davel AP, Rossoni LV, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21:808-816.
30. Lopez-Perez SJ, Ureña-Guerrero ME, Morales-Villagran A. Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Res* 2010; 1317:246-256.
31. Maia LMSS, Amancio-dos-Santos A, Duda-de-Oliveira D, Angelim MK, Germano PCPS, Santos SF, Guedes RCA. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. *Nutr Neurosci* 2009; 12:73-80.
32. Marrannes R, Willems R, DePrins E. Evidence for a role of the NMDA receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res* 1988; 457:226–240.
33. Monte-Guedes CK, Alves EVS, Viana-da-Silva E, Guedes RCA. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing well-nourished and malnourished rats. *Neurosci Lett* 2011; 496:191-94.

34. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino JD, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1978; 2:137–230.
35. Nemeroff CB, Lipton MA, Kizer JS. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Dev Neurosci* 1978; 1:102-09.
36. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164:719-721.
37. Park JH, Yoo KY, Lee CH, Kim IH, Shin BN, Choi JH, Hwang IK, Won MH (2011) Comparison of glucocorticoid receptor and ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity in the adult and aged gerbil hippocampus following repeated restraint stress. *Neurochem Res* 36:1037–1045
38. Rocha-de-Melo AP, Cavalcanti JB, Barros AS, Guedes RCA. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr Neurosci* 2006; 9:155-160.
39. Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, Ghabaee M, Gorji A. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. *Exp Neurol* 2012; 233:438-446.
40. Stagg CJ, Bestmann S, Constantinescu AO, Moreno LM, Allman C, Meckle R, Woolrich M, Near J, Johansen-Berg H, Rothwell JC. Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol* 2011; 589:5845-5855.
41. Sun YM, Hsu HK, Lue SI, Peng MT. Sex-specific impairment in sexual and ingestive behaviors of monosodium glutamate-treated rats. *Physiol Behav* 1991; 50:873-880.

42. Torres LM, Cefaratti C, Perry B, Romani A. Involvement of ERK1/2 and p38 in Mg^{2+} accumulation in liver cells. *Mol Cell Biochem* 2006; 288:191-99.
43. Ureña-Guerrero ME, López-Pérez SJ, Beas-Zárate C. Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. *Neurochem Int* 2003; 42:269–276.
44. Ureña-Guerrero ME, Orozco-Suárez S, López-Pérez SJ, Flores-Soto ME, Beas-Zárate C. Excitotoxic neonatal damage induced by monosodium glutamate reduces several GABAergic markers in the cerebral cortex and hippocampus in adulthood. *Int. J. Devl Neurosci* 2009; 27:845–855.
45. Vecchia D, Pietrobon D. Migraine: a disorder of brain excitatory-inhibitory balance? *Trends Neurosci* 2012; 35:507-520.
46. Viana LC, Lima CM, Oliveira MA, Borges RP, Cardoso TT, Almeida INF, Diniz DG, Bento-Torres J, Pereira A, Batista-de-Oliveira M, Lopes AAC, Silva RFM, Abadie-Guedes R, Amâncio-dos-Santos A, Lima DSC, Vasconcelos PFC, Cunningham C, Guedes RCA, Picanco-Diniz CW. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. *Neuroscience* 2013; 238:280–296.
47. Viggiano E, Ferrara D, Izzo G, Viggiano A, Minucci S, Monda M, De LB. Cortical spreading depression induces the expression of iNOS, HIF-1alpha, and LDH-A. *Neuroscience* 2008; 153:182-88.
48. Zhang WM, Kuchar S, Mozes S. Body fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Brain Res Bull* 1994; 35:383-85.



ARTIGO CIENTÍFICO 2

(SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO)

Title: Treadmill exercise attenuates spreading depression, and increases cortical Iba1 immunoreactivity in normal and monosodium glutamate-treated developing rats

Authors: Cássia Borges Lima¹, Georgina de Sousa Ferreira Soares², Suênia Marcelle Vitor², Belmira Lara da Silveira Andrade-da-Costa¹, Bernardo Castellano³ & Rubem Carlos Araujo Guedes^{2*}.

Address: ¹Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil

²Dept. of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil

³Unit of Medical Histology, Autonomous University of Barcelona, Spain

* Corresponding author (address: Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, PE, Brazil).

E-mails: rguedes@ufpe.br and guedes.rca@gmail.com

Phone: +55-81-21268936

Fax: +55-81-21268473

Abstract

Physical exercise, like excessive consumption of monosodium glutamate (MSG), can affect the morphological and electrophysiological brain organization during development. However, the interaction of both factors remains unclear. Here we analyzed the effect of this interaction on the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD), and on the microglial reaction expressed as Iba1-immunolabeled cells in the rat motor cortex. MSG (2 g/kg or 4 g/kg) was administered every other day during the first 14 days of life. Treadmill exercise started at 21-23 days of life and lasted 3 weeks, 5 days/week, 30 min/d. At 45-60 days, under anesthesia, KCl-elicited CSDs were recorded during 4h on two cortical points, and CSD parameters (velocity, and amplitude and duration of the negative potential change) were calculated. Exercised rats presented lower CSD velocities (3.29 ± 0.18 mm/min) as compared to a sedentary group (3.80 ± 0.18 ; $P < 0.05$). MSG dose-dependently increased the CSD velocities, as compared with saline-treated and exercised rats (3.49 ± 0.19 , 4.05 ± 0.18 and 3.27 ± 0.26 , for the groups treated with 2g/kg MSG, 4g/kg MSG and saline, respectively; $P < 0.05$). The amplitudes (ranging from 14.3 ± 5.9 to 18.7 ± 6.2 mV) and durations (46.7 ± 11.1 to 60.5 ± 11.6 s) of the CSD negative slow potential shift were similar in all groups. Both exercise and MSG-treatment increased Iba1 immunolabeling. The results demonstrate that physical exercise decelerates CSD propagation without changing its amplitude and duration, and without impeding the CSD accelerating action of MSG. These effects were accompanied by cortical microglial reaction. Data also suggest that treadmill exercise early in life can influence cortical electrical activity development.

Key words: Brain development; Brain electrophysiology; Cortical spreading depression; Food flavoring agents; Rats; Treadmill exercise

1. Introduction

Besides the well-known improvement of the cardiovascular function (Karacabey, 2005), physical exercise seems also to positively influence the nervous system, as evaluated by improvement on cognitive function, general arousal and well-being (Martinsen, 2008; Anish, 2005; Hillman, 2004; Cotman et al, 2002a, b). In laboratory animals, exercise has been associated with improved learning and memory (Van et al, 2005), neurogenesis and increased neuronal survival in the hippocampus (Brown et al, 2003; Farmer et al, 2004; Van et al, 2005), and capillary growth and increased vascular flow in cerebellum and motor cortex (Black et al, 1999; Swain et al, 2003). In the hippocampus, neural effects of exercise also include increased expression of neurotrophins (Gomez-Pinilla et al, 2002; Fang et al, 2013), signaling molecules (Shen, 2001), and changes in the expression of genes [Tong, 2001], and enhancement of hippocampal excitability, as indexed by long-term potentiation (Farmer et al, 2004). Therefore, the effects of physical exercise are thought to be neuroprotective, promoting brain health, preconditioning the brain against ischemic insult and improving its long-term functioning (Zhang et al, 2013). In adult animals, these exercise-mediated alterations influence brain excitability, and excitability-dependent neurological diseases (Peixinho-Pena et al, 2012). However, little is known about the electrophysiological effects of exercise in the developing cerebral cortex.

MSG is a neuroexcitatory amino acid largely used to reinforce the flavor of several foods. When consumed in great amounts, MSG can be harmful to the brain (Nemeroff et al, 1978). In mice and monkeys, administration of MSG early in life resulted in brain lesions and obesity later in life (Abraham et al, 1971). In adult Wistar rats, prolonged

administration of high doses of MSG resulted in neurodegenerative changes of the pyramidal cells (Musa, 2013). Experimental evidence also indicates that MSG influences electrical activity in the brain, facilitating seizure initiation (Lopez-Perez et al, 2010).

We have recently demonstrated that MSG treatment early in life increases microglial reaction in the rat cortex, and accelerate the excitability-related brain phenomenon known as cortical spreading depression (CSD; Lima et al, 2013). CSD was first described as a slowly propagating wave of suppression of electrical activity in the rabbit cortex (Leão, 1944; 1947). It is characterized by depolarization of neurons and glial cells that propagates in the gray matter of the central nervous system (Maia et al, 2009; Marrannes et al, 1988). CSD has been described electrophysiologically in laboratory animals (Gorji, 2001) and in humans (Dohmen et al, 2008; Fabricius et al, 2008) as a reversible and slowly propagating phenomenon that can be elicited by chemical, mechanical or electrical stimulation of one point of the cortical surface. Several studies suggest that alterations in cortical excitability are associated with changes of CSD propagation (Liebetanz et al, 2006; Fregni et al, 2007). Measuring CSD velocity of propagation along the cortical tissue is a reasonable and simple method for estimating brain CSD susceptibility under clinically relevant conditions that influence brain excitability (Amaral et al, 2009). Conditions that modify CSD generation and propagation constitute useful opportunities to understand the processes underlying neurological diseases that are dependent on brain excitability, such as epilepsy (Leão, 1944; 1972; Guedes and Cavalheiro, 1997; Guedes et al, 2009). Furthermore, the role played by microglial cells in such neurological disorders is not completely known.

We decided, therefore, to investigate in 45-60 days old rats whether previous physical (treadmill) exercise (performed from 21-23 to 42-44 days of life) could interact

with MSG, regarding the effects on CSD and microglial reaction. We characterized CSD parameters (propagation velocity, and amplitude and duration of the negative slow potential shift), and Iba1-immunolabeling microglial reaction in exercised rats and compared them to those of sedentary animals. Furthermore, in exercised rats we compared MSG- and saline-treated groups. We hypothesized that treadmill exercise would attenuate the brain's ability to propagate CSD, and would interact with MSG, modifying its action on CSD propagation.

2. Materials and methods

2.1 Animals

The animals were handled in accordance with the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA). They were housed in polypropylene cages (51 x 35.5 x 18.5 cm) in a room maintained at 22 ± 1 °C with a 12:12-h light–dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and were fed a lab chow diet with 23% protein (Purina do Brazil Ltd.).

2.2 Treadmill exercise

Male Wistar rat pups (n= 46) were submitted, from post natal day 21-23 to 42-44, to daily sessions of running in a treadmill (Insight EP-131, 0° inclination; 30 min/d, 5 d/week, total time: 3 weeks). They were compared to sedentary rats (n=15) that were placed daily in the treadmill apparatus for a time-period similar to that of the exercised group, but the treadmill apparatus remained off.

2.3 Treatment with MSG

Part of the exercised rats (n=28) was treated with MSG. The animals received subcutaneous injections of 2 g/kg (n=13) or 4 g/kg MSG (n=15; respectively groups MSG-2 and MSG-4), administered every other day during the first 14 days of life. The rest of the exercised rats (n=18) originated two control groups: one, injected with saline (n=12) and the other, not injected at all (group naïve; n=6).

2.4 Body weights

The body weights were measured at postnatal days 2, 10 and 45-50.

2.5 CSD recording

When the animals were 45 to 60 days old, they were submitted to CSD recording during 4 hours, as previously described (Accioly et al, 2012). Under anesthesia (1g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, ip), the rat's head was secured in a stereotaxic apparatus (Kopf, USA), and three trephine holes (2–3 mm in diameter) were drilled on the right side of the skull: two holes were at the parietal bone and one at the frontal bone; they were aligned in the anteroposterior direction and were also parallel to the midline. 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 (frontal) hole. The electrocorticogram (ECoG) and the slow direct-current (DC) potential change accompanying CSD were recorded simultaneously at the two parietal points on the cortical surface by using a pair of Ag-AgCl agar-Ringer electrodes. These electrodes consisted of plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter), filled with

Ringer solution solidified by adding 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. The pipettes were fixed together pair-wise with cyanoacrylate glue, so that the interelectrode distance was kept constant for each pair (range: 4–5.5 mm). The pair of electrodes was fixed to the electrode holder of the stereotaxic apparatus, so that the electrodes could be gently placed on the intact dura-mater, under low-power microscope control, without any excessive pressure on the cortical surface. A common reference electrode, of the same type, was placed on the nasal bones. The velocity of CSD propagation was calculated based on the time required for a CSD wave to cross the interelectrode distance. In the measurement of CSD velocities, the initial point of each DC negative rising phase was used as the reference point. We also calculated the amplitude and duration of the CSD negative slow potential shifts. During the recording session, rectal temperature was maintained at $37\pm1^{\circ}\text{C}$ by means of a heating blanket. At the end of the recording session, the animal was submitted to euthanasia by an overdose of anesthetic.

2.6 Iba1 immunolabeling of microglial cells

A group of 13 rats treated with saline (n=4), MSG-2 (n=4) and MSG-4 (n=5) were perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde diluted in 0.1M phosphate-buffered saline, pH 7.4. After being immersed in the fixative during 4 h, the brains were transferred to a 30% (w/v) sucrose solution for cryoprotection. Longitudinal serial sections (40- μm thickness) were obtained at -20°C with a cryoslicer (Leica 1850). Sections were immunolabeled with a polyclonal antibody against the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) to detect microglia (anti-Iba-1, #019-19741; Wako Pure Chemical

Industries Ltd., Osaka, Japan). Free-floating sections were submitted to endogenous peroxidase blocking (2% H₂O₂ in 70% methanol for 10 min); then, sections were incubated for 1 h in Blocking Buffer solution (BB) containing 0.05 M Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4, 10% fetal calf serum, 3% bovine serum albumin and 1% Triton X-100. Afterwards, sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-Iba-1 (1:1,500 diluted in BB solution). After three washes with TBS+ 1% Triton, sections were incubated at room temperature for 1 h with biotinylated anti-rabbit (1:500) secondary antibodies. Sections were then rinsed in TBS+ 1% Triton and incubated with horseradish peroxidase streptavidin (1:500). The peroxidase reaction was visualized by incubating the sections in Tris buffer containing 0.5 mg/ml 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.33 µl/ml H₂O₂. Finally, sections were mounted, dehydrated in graded alcohols and after xylene treatment coverslipped in Entellan®. For each animal, densitometric analysis was performed on four parallel longitudinal sections. In each section, we analyzed photomicrographs of four fields within the motor cortex (layer 5) using the software Image J (National Institutes of Health, USA, version 1.46r). A Leica DMLS microscope coupled to SAMSUNG high level color camera (model SHC-410NAD) was used to obtain digital images from brain sections. Images from the motor cortex immunoreacted for Iba1 were obtained with a 20× microscope objective. Care was taken to obtain the digital images using the same light intensity conditions. We analyzed the percentage of the area occupied by the Iba1-labeled cells, as well as their total immunoreactivity expressed as arbitrary units.

2.7 Statistics

Intergroup differences were compared by ANOVA, followed by a post hoc (Holm–Sidak) test when indicated. The statistical software used was “Sigmastat®” version 3.10. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Body weight

As illustrated in Fig 1-A, on the day of the CSD recording the exercised rats had lower body weights (168.1 ± 22.7 g; $n=15$) when compared with a group of 10 sedentary animals (214.0 ± 32.5 g; $P<0.05$). The two groups that were exercised and treated with MSG (Fig. 1-B) displayed lower weights (141.9 ± 34.7 g and 140.0 ± 25.1 g, for the groups M2 and M4 respectively) as compared with the group exercised and treated with saline (165.1 ± 21.1 g; $P<0.05$). This group displayed weights that were similar to non-treated (“naïve”) rats (172.7 ± 26.3 g).

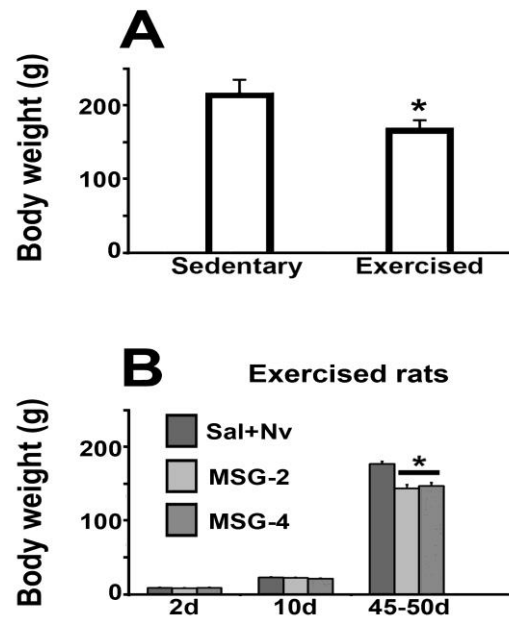


Figure 1- A, body weights of 45-50 day-old sedentary and exercised rats, showing a significant weight reduction in the exercised group. B, body weights of 2, 10 and 45-50 day-old exercised rats. Sal, Nv, MSG-2 and MSG-4 are groups that received respectively saline, no treatment (naïve group), and 2 g/kg and 4 g/kg of MSG (subcutaneous injections). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. The asterisks indicate values significantly lower than the corresponding control values ($P<0.05$; ANOVA plus Holm-Sidak test).

3.2 CSD recording in exercised rats

Fig. 2 shows typical electrophysiological recordings (slow DC potential change and ECoG) in three exercised rats, representative of the naïve, Saline and MSG-4 groups. As a rule, the 1-min stimulation with 2% KCl at one point of the 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 (see stimulation- and recording-points in the diagram of fig. 2, lower-left panel). In each recording point, the ECoG depression and the slow potential change confirmed the presence of CSD, after KCl application. As a rule, the electrophysiological changes caused by CSD always recovered after a few minutes, and we have kept a 20 min interval between subsequent KCl stimulations.

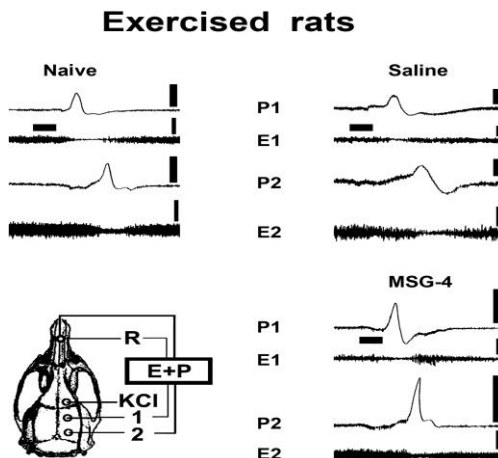


Figure 2- Electrocorticogram (E) and slow potential change (P) recorded during cortical spreading depression (CSD), in three 45-60 days-old rats from the group naïve (Nv), treated with saline (Sal) and treated with 4 g/kg monosodium glutamate (MSG-4). The horizontal bars in P1 show the period (1 min) of stimulation with 2% KCl, necessary to elicit CSD. The vertical bars equal -10mV and -1mV , respectively for the P and E recordings (negativity is upwards). The places of KCl application and of the reference electrode are indicated in the skull diagram, which also shows the recording points 1 and 2 (from which the traces marked at the center with the same numbers were recorded).

3.3 Measurement of CSD parameters

In the panel A of Fig.3, we present the mean CSD propagation velocities in sedentary and exercised rats. In the exercised group, CSD velocities were significantly lower (3.29 ± 0.18 mm/min), compared with the sedentary rats (3.80 ± 0.18 mm/min; $P < 0.05$).

The panel B of Fig. 3 displays the CSD velocities in the exercised rats submitted to MSG or saline treatment. Compared with the saline (3.31 ± 0.19 mm/min) or the naïve group (3.25 ± 0.17 mm/min), the MSG-2 and MSG-4 groups presented mean velocities significantly higher (respectively 3.51 ± 0.18 mm/min and 4.05 ± 0.18 mm/min; $P < 0.05$).

The amplitude and duration of the negative slow potential shift, which is the hallmark of CSD, are shown in table 1. The mean amplitude (in mV) varied from 15.3 ± 5.4 to 17.4 ± 7.6 mV. The mean duration ranged from 51.0 ± 9.2 to 58.8 ± 10.8 . ANOVA revealed no significant intergroup difference (Table 1).

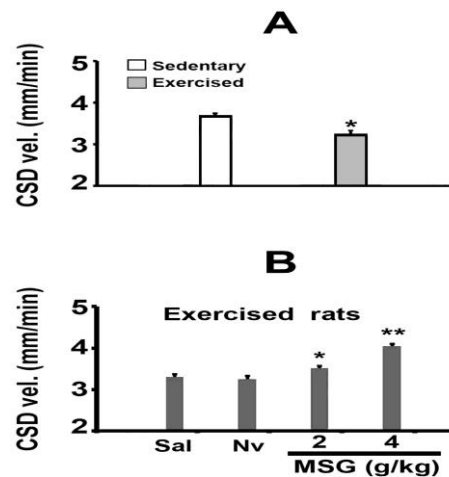


Figure 3- A, CSD velocities of 45-60 day-old sedentary and exercised rats, showing a significant velocity reduction in the exercised group. **B,** Velocities of propagation of CSD of 45-60 day-old exercised rats. Sal, Nv, MSG-2 and MSG-4 are groups that received respectively saline, no treatment (naïve group), and 2 g/kg and 4 g/kg of MSG (subcutaneous injections). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of twelve CSD episodes elicited, at 20-min intervals, by 1-min KCl application during the 4h recording period. * $P < 0.05$

Table 1 Amplitude and duration of the negative slow potential shifts of cortical spreading depression in exercised rats treated with monosodium glutamate (MSG). MSG-2, 2 g/kg; MSG-4, 4 g/kg. The treatment groups were compared to control groups treated with saline or no treatment (naïve). The two control groups were pooled, as they did not differ. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. No significant difference was observed.

Exercised Groups	Amplitude (mV)	Duration (s)
Saline + Naïve (n= 10)	15.3 $\pm$ 5.4	51.0 $\pm$ 9.2
MSG-2 (n= 8)	17.4 $\pm$ 7.6	57.6 $\pm$ 9.4
MSG-4 (n= 6)	16.2 $\pm$ 3.0	58.8 $\pm$ 10.8

3.4 Iba1 immunohistochemistry and densitometric analysis

Compared to a sedentary group, exercised animals presented higher percentage of labeled area (Fig. 4-A1), and a higher immunoreactivity as expressed in arbitrary units (Fig. 4-A2). One great advantage of the specific immunolabeling of the calcium-binding protein Iba1 in the microglial cells is that it enables the analysis of microglial distribution in the cerebral cortex without the interference of the cortical blood vessels (Fig. 4-B1). Compared to the saline-injected controls, MSG-treated animals presented higher percentage of labeled area (Fig. 4-B2), and a lower immunoreactivity as expressed in arbitrary units (Fig. 4-B3).

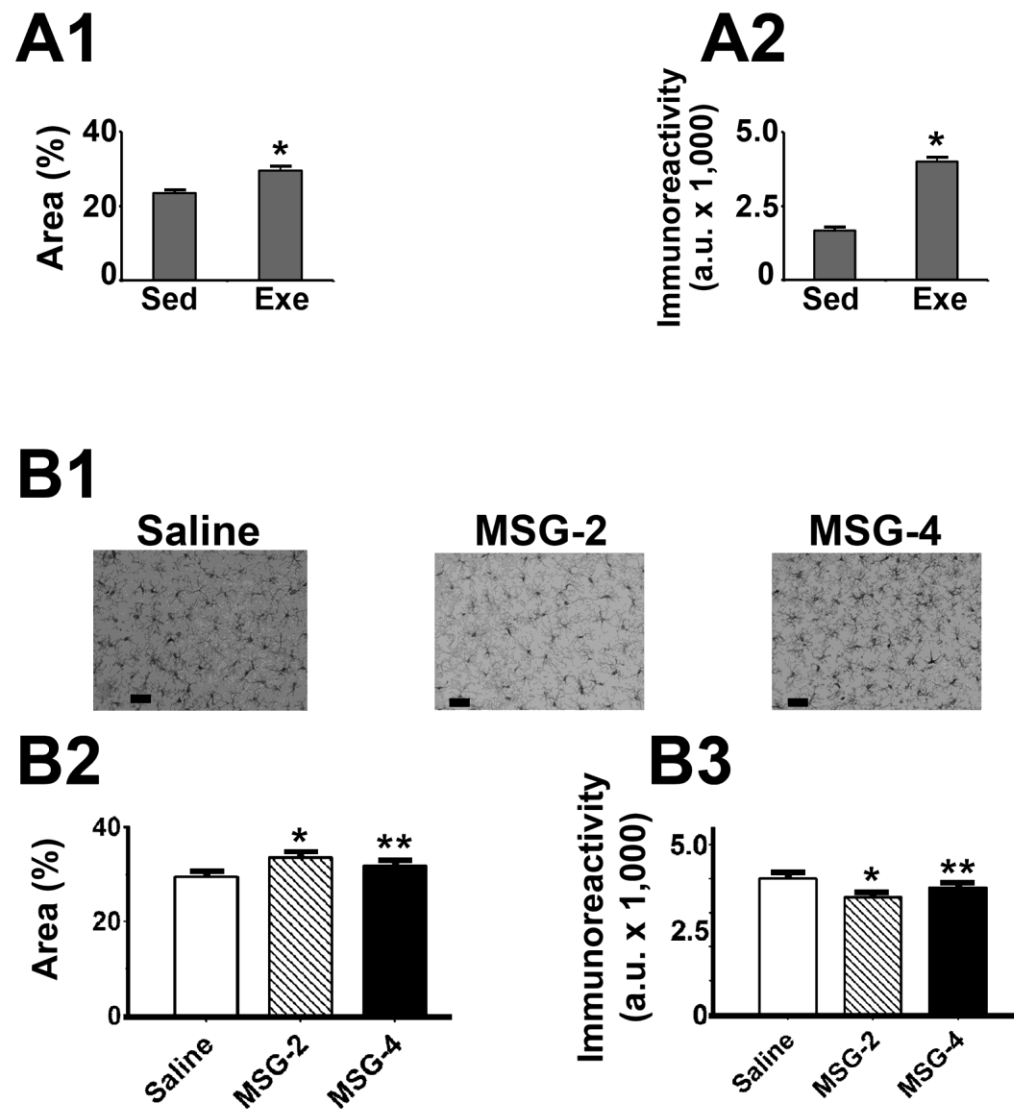


Figure 4- A, percent area occupied by the Iba1-labeled cells (A1) and immunoreactivity expressed as arbitrary units (a.u.) (A2) of 50-55 day-old sedentary and treadmill-exercised rats. B1, digital images of Iba1-immunolabeled microglial cells in longitudinal sections through the motor cortex of three exercised rats treated respectively with saline, 2g/kg MSG and 4g/kg MSG. Scale bars = 20 μ m. B2, percent area occupied by the Iba1-labeled cells shown in part B1 of this figure. B3, immunoreactivity expressed as arbitrary units (a.u.). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. *P<0.05 compared to the control group. ** P<0.05 compared to the Saline and MSG-2 groups (ANOVA plus Holm-Sidak test).

4. Discussion

In the present work we have demonstrated interactions between treadmill exercise and MSG-treatment on the brain susceptibility to CSD and microglial reaction in the cerebral cortex. The two factors (exercise and MSG) seem to be important determinants for the body weight reduction, as shown also by others (Kiss et al, 2007; Kim et al, 2008), and for the CSD and microglial alteration, as presently documented. These factors had not yet been combined in a single study involving CSD. The novel electrophysiological and immunohistochemical findings may be considered an interesting contribution to the understanding of the effects of exercise and MSG excitotoxicity on the brain.

The present study showed a decrease in the body weight in the 45-50 days old rats which were submitted to treadmill exercise. The weight reduction probably results from the exercise-induced increasing of mitochondrial activity, with consequent mobilization of fat, and more fatty acid oxidation during exercising, as recently demonstrated (Moura et al, 2013). In rats, exercising helps in preventing disturbances in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters associated to the metabolic syndrome (Moraes-Silva et al 2013). In humans, physical activity has favorable effects on all components of the metabolic syndrome (Montesi et al, 2013). These recent pieces of evidence support the postulation that the practice of physical exercise early in life can contribute to the prevention of obesity and insulin resistance. The present study also showed that MSG treatment can potentiate the deficiency in the body weight in rats subjected to treadmill exercising; the MSG-exercise association may cause a series of metabolic effects, as demonstrated by others on swimming-exercised animals (Andreazzi et al, 2009; Miranda et al, 2013).

Information on the brain long-lasting electrophysiological effects of early physical exercise is scarce. One reported relevant effect of physical exercise is neural protection in a chronic mouse model of Parkinson's disease (Lau et al, 2011). Also, exercising has been shown to promote brain angiogenesis (Isaacs et al, 1992), and to increase the levels of mRNA for NMDA-type glutamate receptors (Farmer et al, 2004). It also increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and for nerve growth factor in rat brain (Gomez-Pinilla et al, 2002; Soya et al, 2007). This is of particular importance during development, as BDNF is the prominent regulator of synaptic plasticity in the brain (Rothman et al, 2013). Experience and learning events associated to treadmill exercising early in life can modulate the functional maturation of the brain by neuroplastic processes. Stimuli from the environment occurring during early postnatal brain development may result in more complex neural circuitry (Linkenhoker, 2005). In this study, we found that physical exercise per se reduced CSD propagation velocities, which is coherent with a recent report (Batista-de-Oliveira et al, 2012) demonstrating a similar CSD effect of exercise in malnourished and aged rats. Because the capacity for neuroplasticity decreases with increasing age (Akopian et al, 2006; Lynch et al, 2006) it is very important to assess how exercise may beneficially regulate neuroplasticity during early life, and to determine the basic mechanism of such effects, in the normal brain. Taken together, evidence from others and from the present study supports the suggestion that physical exercise early in life may decrease neuronal excitability in the rat cortex. Furthermore, the exercise-induced enhancement in the cortical microglial reaction raises the question whether this cell reaction is an epiphenomenon, or is a necessary event for the CSD effects of exercising.

Factors such as the increase in the number of synaptic connections, and increased myelination might occur as a consequence of physical exercise. Augmented synaptic connectivity might increase the distance to be traveled in communication between cell processes (Pysh et al, 1979), and this increased intercellular distance would be occupied by excessive myelin that can result from the increased activity of the motor cortex due to the exercise. Considering that the CSD propagation depends largely on the finely balanced electrochemical equilibrium of the extracellular milieu, as well as on the neuron-glia interactions (Martins-Ferreira et al, 2001), it is not surprising that the CSD propagation would be influenced by the inter-neuronal and neuron-glia distances, which among other factors is influenced by the amount of myelin between the cortical cells. Of note, it has been demonstrated that the propagation rate of CSD inversely correlates with cortical myelin content in rodents submitted to toxic and autoimmune induced cortical demyelination, in which CSD was significantly accelerated, and in neuregulin-1 type I transgenic mice displaying cortical hypermyelination, in which CSD propagation was reduced (Merkler et al, 2009). This dichotomous effect receives support from nutritional studies: malnutrition of young rats was shown to cause dysmyelination within the CNS (Almeida et al, 2005). Interestingly, malnourished and overnourished rats early in life respectively displayed higher and lower CSD velocities than well-nourished control animals (Rocha-de-Melo et al, 2006). It was thus speculated that deficient myelination and hypermyelination may respectively account for these observations, but other factors such as altered cell-packing density, neuron-to-glia ratio, or synaptic neurotransmitters (e.g., the serotonergic and the glutamatergic systems) have to be also considered as possible causal agents. Concerning the serotonergic system, compelling evidence indicated that changes of the serotonergic activity inversely influence brain excitability

(Ingelstrom & Heyward, 2012). We know from the literature that physical exercise can alter the branched chain amino acids/tryptophan ratio in the circulating blood, and this increases the tryptophan crossing throughout the blood–brain barrier and increase the serotonin production in the neurons (Blomstrand, 2001). In line with this idea, some studies have unequivocally demonstrated that increased brain serotonin availability antagonizes CSD propagation (Guedes et al, 2002; Amâncio-dos-Santos et al, 2006), whereas decreasing serotonin activity accelerates CSD (Amâncio-dos-Santos et al, 2013).

The cerebral cortex constitutes an important target area for the actions of physical exercise and MSG during brain development. It is known that early administration of MSG to rat pups can result in excitotoxicity and neuronal degeneration by over-activating glutamate receptors (Beas-Zárate et al, 2001). This, in the cell networks of the cerebral cortex and hippocampus, can disrupt the physiological balance between glutamatergic and GABAergic influences (Ureña-Guerrero et al, 2009), predisposing the organism to excitability-dependent neurological diseases, such as epilepsy. Also, excessive activation of glutamate receptors is thought to contribute to neurodegeneration following a wide range of neurological insults including ischemia, trauma, hypoglycemia and epileptic seizures (Pellegrini-Gianpietro et al, 1997). According to these authors, one possible underlying mechanism that contributes to the loss of neurons associated with such brain disorders is an abnormal influx of Ca^{2+} through glutamate receptor channels. In this context, the enhancement of the microglial cells immunolabeled with a monoclonal antibody against the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) could be interpreted as a specific cell reaction against imbalanced calcium influx. Interestingly, both glutamate receptor activation and transmembrane calcium flux alterations are known

to influence CSD, as demonstrated by our laboratory (Guedes et al, 1988) and by others (Marranes et al, 1988; Siesjo and Bengtsson, 1989).

In conclusion, we demonstrated that the cerebral cortex of young rats submitted to treadmill exercise and to MSG presented respectively reduced and increased susceptibility to CSD, as indexed by the corresponding changes in the CSD propagation velocities, and increased microglial reaction, as compared to control animals. Both electrophysiological and immunohistochemical data revealed interaction between exercise and MSG treatment. We suggest that this interaction reflects excitability effects of both treatments involving glutamate/GABA-based modulation of cortical excitability. Considering that the rats from our study were healthy (i.e. they had no demyelinating, nor any other neurological disorder), our findings of an exercise-associated decelerating CSD propagation suggest that physical exercise can help in preventing neurological insults as MSG neurotoxicity, but also can have a beneficial action on the developing normal brain, and this action could be long lasting, with a positive reflection on the aged brain, as recently suggested (Batista-de-Oliveira et al, 2012).

Acknowledgements

The authors thank the financial support from the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Procad no. 131/2007), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe—IBPG no. 0085-2.07/09), 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 from CNPq (no. 301190/2010-0).

Conflicts of interests: **None**

Reference List (Artigo 2)

- Abraham, R., Dougherty, W., Golberg, L. & Coulston, F. (1971) The response of the hypothalamus to high doses of monosodium glutamate in mice and monkeys. Cytochemistry and ultrastructural study of lysosomal changes. *Exp. Mol. Pathol.*, **15**:43-60.
- Accioly, N.E., Benevides, R.D.L., Costa, B.L.S.A. & Guedes, R.C.A. (2012) Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. *Int. J. Devl. Neurosci.*, **30**:405-410.
- Akopian, G. & Walsh, J.P. (2006) Pre- and postsynaptic contributions to age-related alterations in corticostriatal synaptic plasticity. *Synapse*, **60**: 223-238.
- Almeida, M.F., Silveira, A.C. & Guedes, R.C.A. (2005) Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. *Nutr. Neurosci.*, **8**:91–99.
- 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. (2006) Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Exp. Neurol.*, **200**:275-282.
- Amancio-dos-Santos, A., Maia, L.M.S.S., Germano. P.C.P.S., Negrão, Y.D.S. & Guedes, R.C.A. (2013) Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **706**:70-75.
- Amaral, A.P., Barbosa, M.S., Souza, V.C., Ramos, I.L. & Guedes, R.C.A. (2009) Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrene enhances spreading depression in rats. *Exp. Neurol.*, **219**:492-498.

- Andreazzi, A.E, Scomparin, D.X., Mesquita, F.P., Balbo, S.L., Gravena, C., De Oliveira, J.C., Rinaldi, W., Garcia, R.M.G., Grassioli, S. & Mathias, P.C.F. (2009) Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *J. Endocrinol.*, **201**:351-359.
- Anish, E.J. (2005). Exercise and its effects on the central nervous system. *Curr. Sports Med. Rep.*, **4**: 18-23.
- Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A., Mendes-da-Silva, R.F. & Guedes, R.C.A. (2012) Favorable and unfavorable lactation modulates the effects of electrical stimulation on brain excitability: a spreading depression study in adult rats. *Life Sci.*, **91**:306-311
- Beas-Zárate, C., Rivera-Huizar, S.V., Martinez-Contreras, A., Feria-Velasco, A. & Armendariz-Borunda, J. (2001) Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. *Neurochem. Internat.*, **39**:1–10.
- Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A. & Greenough, W.T. (1990) Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5568-5572.
- Blomstrand E. (2001) Amino acids and central fatigue. *Amino Acids.*, **20**:25-34.
- Brown, J., Cooper-Kuhn, C.M., Kempermann, G., Van, P.H., Winkler, J., Gage, F.H. & Kuhn, H.G. (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.*, **17**: 2042-2046.
- Costa-Cruz, R.R.G., Santos, A.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.

- Cotman, C.W. & Berchtold, N.C. (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.*, **25**:295-301.
- Cotman, C.W. & Engesser-Cesar, C. (2002) Exercise enhances and protects brain function. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **30**: 75-79.
- Dohmen, C., Sakowitz, O.W., Fabricius, M., Bosche, B., Reithmeier, T., Ernestus, R.I., Brinker, G., Dreier, J.P., Woitzik, J., Strong, A.J. & Graf, R. (2008) Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann. Neurol.*, **63**:720-728.
- Fabricius, 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 depolarization in the acutely injured human brain. *Clin. Neurophysiol.*, **119**:1973-1984.
- Fang, Z.H., Lee, C.H., Seo, M.K., Cho, H., Lee, J.G., Lee, B.J., Park, S.W. & Kim, Y.H. (2013) Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. *Neurosci. Res.*, DOI **10.1016/j.neures.2013.04.005**
- Farmer, J., Zhao, X., Van, P.H., Wodtke, K., Gage, F.H. & Christie, B.R. (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, **124**: 71-79.
- Fregni, F., Liebetanz, D., Monte-Silva, K.K., Oliveira, M.B., Santos, A.A., Nitsche M.A., Pascual-Leone, A. & Guedes, R.C. (2007) Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. *Exp. Neurol.*, **204**: 462-466.

- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R.R., Molteni, R. & Edgerton, V.R. (2002) Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity, *J. Neurophysiol.*, **88**: 2187-2195.
- Gorji, A., (2001) Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res. Rev.*, **38**:33-60.
- Guedes, R.C.A & Cavalheiro, E.A. (1997) Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epil. Res.*, 27:33-40.
- Guedes, R.C.A., Andrade, A.F.D. & Cavalheiro, E.A. (1988) Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: Cavalheiro E.A., Lehman J., Turski L. (Eds). *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research*, Alan R. Liss. Inc., New York, N.Y., pp.667-670.
- Guedes, R.C.A., Santos, A.A., Manhães-de-Castro, R. & Costa-Cruz, R.R.G. (2002) Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr. Neurosci.*, 5:115-123.
- Guedes, R.C.A., Oliveira, J.A., Amancio-dos-Santos, A. & Garcia-Cairasco, N. (2009) Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). *Epil. Res.* **83**:207-214.
- Hillman, C.H., Belopolsky, A.V., Snook, E. M., Kramer, A.F. & McAuley, E. (2004) Physical activity and executive control: implications for increased cognitive health during older adulthood. *Res. Q. Exerc. Sport.*, 75: 176-185.
- Igelström, K.M. & Heyward, P.M. (2012) The antidepressant drug fluoxetine inhibits persistent sodium currents and seizure-like events. *Epil. Res.* **101**:174-181.
- Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., Black, J.E. & Greenough, W.T. (1992) Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **12**: 110-119.

- Karacabey, K. (2005) Effect of regular exercise on health and disease. *Neuro Endocrinol. Lett.*, **26**: 617-623.
- Kim, J-H., Kwak, H.-B., Leeuwenburgh, C. & Lawler, J.M. (2008) Lifelong exercise and mild (8%) caloric restriction attenuate age-induced alterations in plantaris muscle morphology, oxidative stress and IGF-1 in the Fischer-344 rat. *Exp. Gerontol.*, **43**: 317–329.
- Kiss, P., Hauser, D., Tamas, A., Lubics, A., Racz, B., Horvath, Z., Farkas, J., Zimmermann, F., Stepien, A., Lengvari, I. & Reglodi, D. (2007) Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.*, **12**:85-93.
- Lau, Y.S., Patki, G., Das-Panja, K., Le, W.D. & Ahmad, S.O. (2011) Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur. J. Neurosci.* **33**:1264-1274
- Leão, A.A.P. (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, **7**:359–390.
- Leão, A.A.P. (1947) Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.*, **10**:409-414.
- Leão, A.A.P. (1972) Spreading depression. In: Purpura DP, Penry K, Tower DB, Woodbury DM, Walter RD (eds.) *Experimental Models of Epilepsy*. Raven Press, New York. pp. 173–195.
- Liebetanz, D., Fregni, F., Monte-Silva, K.K., Oliveira, M.B., Amancio-dos-Santos, A., Nitsche, M.A. & Guedes, R.C.A. (2006) After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neurosci. Lett.*, **398**:85-90.

- Lima, C.B., Soares, G.S.F., 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. in Press*.
- Linkenhoker, B.A., von der Ohe, C.G. & Knudsen, E.I. (2005) Anatomical traces of juvenile learning in the auditory system of adult barn owls, *Nat. Neurosci.*, **8**: 93-98.
- Lopez-Perez, S.J., Ureña-Guerrero, M.E. & Morales-Villagran, A. (2010) Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Res.*, **1317**:246-256.
- Lynch, G., Rex, C.S. & Gall, C.M. (2006) Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Res. Rev.*, **5**:255-280.
- Maia, L.M.S.S, Amancio-dos-Santos A., Duda-de-Oliveira D., Angelim M.K., Germano P.C.P.S., Santos S.F. & Guedes R.C.A. (2009) L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. *Nutr. Neurosci.*, **12**:73-80.
- Marrannes, R., Willems, R. & DePrins, E. (1988) Evidence for a role of the NMDA receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res.*, **457**:226–240.
- Martins-Ferreira, H., Nedergaard, M. & Nicholson, C. (2000) Perspectives on spreading depression. *Brain Res. Rev.*, **32**:215–234.
- Martinsen, E.W. (2008) Physical activity in the prevention and treatment of anxiety and depression. *Nord. J. Psychiatry Suppl.*, **47**:25-29.
- Merkler, D., Klinker, F., Jurgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B.G., Sereda, M.W., Stadelmann-Nessler, C., Guedes, R.C.A., Bruck, W. & Liebetanz, D. (2009) Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.*, **66**: 355-365.

- Miranda, R.A., Branco, R.C., Gravena, C., Barella, L.F., da Silva Franco, C.C., Andreazzi, A.E., de Oliveira, J.C., Picinato, M.C. & de Freitas Mathias, P.C. (2013) Swim training of monosodium L-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. *Endocrine*, **43**:571-578.
- Montesi, L., Moscatiello, S., Malavolti, M., Marzocchi, R. & Marchesini, G. (2013) Physical activity for the prevention and treatment of metabolic disorders. *Intern. Emerg. Med.*, pp 1-12, DOI 10.1007/s11739-013-0953-7.
- Moraes-Silva, I.C., Mostarda, C., Moreira, E.D., Silva, K.A., dos Santos, F., de Angelis, K., Farah, V. M. & Irigoyen MC (2013) Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. *J. Appl. Physiol.*, **114**:786-791.
- Moura, L.P., Sponton, A.C., de Araújo, M.B., Dalia, R.A., Pauli, J.R. & Rostom de Mello, M.A. (2013) Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats. *Lipids. Health Dis.*, **6**:12-29.
- Musa, M. & Sunday, A.M. (2013) Clumping of the nuclei material of pyramidal cells of adult Wistar rats following oral administration of monosodium glutamate. *Res. Rev. J. Med. Health Sci.*, **2**:10-15.
- Nemeroff, C.B., Lipton, M.A. & Kizer, J.S. (1978) Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Dev. Neurosci.*, **1**:102-109.
- Peixinho-Pena, L.F., Fernandes, J., de Almeida, A.A., Novaes Gomes, F.G., Cassilhas, R., Venancio, D.P., de Mello, M.T., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A. & Arida, R.M. (2012) A strength exercise program in rats with epilepsy is protective against seizures. *Epil. Behav.*, **25**:323-328.

- Pysh, J.J., Weiss, G.M. (1979) Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. *Science*, **206**:230-232.
- 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.
- Rothman, S.M. & Mattson, M.P. (2013) Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience*, **239**:228–240.
- Shen, H., Tong, L., Balazs, R. & Cotman, C.W. (2001) Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience*, **107**:219-229.
- Siesjö, B.K. & Bengtsson, F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **9**:127-140.
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C.C., Kimpara, A., Iimura, M, Fujikawa, T., Chang, H., McEwen, B.S. & Nishijima, T. (2007) BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**:961-967.
- Swain, R.A., Harris, A.B., Wiener, E.C., Dutka, M.V, Morris, H.D., Theien, B.E., Konda, S., Engberg, K., Lauterbur, P.C. & Greenough, W.T. (2003) Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, **117**:1037-1046.
- Tong, L., Shen, H., Perreau, V.M., Balazs, R. & Cotman, C.W. (2001) Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol. Dis.*, **6**:1046-1056.

- Van, P. H., Shubert, T., Zhao, C. & Gage, F.H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, *J. Neurosci.*, **25**:8680-8685.
- Zhang, Y., Zhang, P., Shen, X., Tian, S., Wu, Y., Zhu, Y., Jia, J., Wu, J. & Hu, H. (2013) Early exercise protects the blood-brain barrier from ischemic brain injury via the regulation of MMP-9 and occludin in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**:11096-11112.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS DA APLICAÇÃO TÓPICA DO GLUTAMATO MONOSSÓDICO NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO.

Suênia Marcelle Vitor; Cássia Borges Lima; Rubem Carlos Araújo Guedes

Resumo:

O objetivo principal foi verificar possíveis alterações eletrofisiológicas cerebrais resultantes da aplicação tópica (na superfície do córtex cerebral) de glutamato monossódico (MSG; solução com 50 mg/ml) em ratos neonatos previamente submetidos à aplicação subcutânea de MSG e solução salina (veículo) quando recém-nascidos. Essas alterações foram avaliadas em 19 ratos exercitados (corrida em esteira) e 17 sedentários, os quais foram submetidos, sob anestesia, ao registro eletrofisiológico do fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC), em dois pontos da superfície cortical (denominados ponto 1 e ponto 2). Foram encontrados, tanto nos grupos sedentários quanto nos exercitados, menores velocidades de propagação da DAC após a aplicação tópica do MSG, no ponto 1 e no ponto 2, em relação às velocidades basais (antes da aplicação do MSG). Observou-se também que houve uma reversão parcial desse efeito após a suspensão da aplicação tópica de MSG. Embora significativa, essa recuperação não alcançava os valores médios das velocidades da DAC no período basal (controle). Foi observado também que o exercício físico diminuiu as velocidades da DAC, em comparação com os animais sedentários.

Palavras-chave: exercício físico; aplicação tópica de glutamato monossódico; depressão alastrante cortical.

INTRODUÇÃO

O glutamato monossódico (MSG), é utilizado mundialmente como um intensificador de sabor aumentando a palatabilidade dos alimentos e, conseqüentemente a sua ingestão. O ácido L-glutâmico é o aminoácido componente do MSG que pode ser lesivo ao sistema nervoso central, quando consumidos em grande quantidade (Kizer et al, 1978). Em relação ao sistema nervoso, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos; estimula os receptores de glutamato e desempenha um papel importante tanto em processos fisiológicos como nos patológicos (Mattson 2008; Ganong 2005). O exercício físico promove alterações e adaptações fisiológicas benéficas, incluindo o aumento do fluxo sanguíneo

cortical, melhora da resposta ao stress, aumento do gasto energético e consequente redução no peso, nos índices de gordura corporal e melhoria nos parâmetros metabólicos e endócrinos.

Um modelo interessante para o estudo dos efeitos provocados pelo MSG no sistema nervoso central (SNC) e dos possíveis efeitos do exercício é o fenômeno denominado “depressão alastrante da atividade elétrica cerebral” ou, simplesmente depressão alastrante cortical (DAC). Esta consiste em uma "onda" reversível e propagável de redução ("depressão") da atividade elétrica cerebral (tanto a espontânea como a provocada), acompanhada do aparecimento de uma "variação lenta de voltagem" (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno, em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto da superfície cerebral (Leão, 1944, Leão, 1947). Algumas condições de interesse clínico podem alterar essa susceptibilidade, dificultando a propagação da DAC, enquanto outras a facilitam (para uma revisão, consultar Guedes, 2011).

Este trabalho visou complementar os achados iniciais (Lima et al, 2013) do tratamento sistêmico com MSG, avaliando os efeitos da aplicação tópica desse aminoácido, associada ao exercício físico, sobre a DAC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (Processo no. 23076.015494/2013-71), foram utilizados trinta e seis (36) ratos Wistar machos, recém-nascidos (obtidos no biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE), dos quais 23 receberam MSG (4g/kg de peso corporal) por via subcutânea, a cada dois dias, nos primeiros 14 dias de vida. Este grupo foi comparado aos outros 13 animais, que receberam injeções de solução salina (veículo) no mesmo volume do grupo experimental, também durante o mesmo período neonatal (situação controle). Os animais que receberam MSG foram subdivididos em exercitados (n=12) e sedentários (n=11) assim como o grupo salina, subdivididos em exercitados (n=7) e sedentários (n=6). O exercício consistiu em corrida em esteira sendo 3 semanas de treinamento, 5 vezes por semana com trinta minutos de corrida por dia. A velocidade da corrida aumentou gradualmente, passando de 5 m/min, na primeira semana, para 10 m/min na segunda semana e 15 m/min na terceira semana. Os animais dos dois grupos sedentários permaneceram na esteira pelo mesmo período, porém, com o equipamento desligado. Para a realização dos registros eletrofisiológicos, os animais foram anestesiados com uma solução de uretana 10% + cloralose 0,4%, à dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intra-peritoneal. O registro foi feito em dois pontos do hemisfério cerebral direito (região parietal), por um período contínuo de 5 horas. A cada intervalo de 20 minutos a DAC foi desencadeada, por estimulação química. Após uma hora de “registro basal” (no qual foram deflagrados 3 episódios de DAC), foram feitas três (3) aplicações tópica de MSG na concentração de 50mg/ml no primeiro ponto do registro (ponto 1) num intervalo de 20 minutos. Em seguida, houve um período de recuperação (sem aplicação tópica) durante 1 hora, em que 3 episódios de DAC foram registrados. Em continuação, foram feitas 3 aplicações tópicas no segundo ponto do registro (ponto 2) ao longo de 1 hora, seguindo-se, finalmente, um período de recuperação (registro de mais 3 episódios de DAC, sem aplicação tópica). Foram comparadas

as velocidades da DAC antes e após a aplicação tópica de MSG. A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base no tempo necessário para a DAC percorrer a distância entre os dois pontos de registro. As comparações, no mesmo animal, entre as velocidades antes e depois da aplicação tópica de MSG foram feitas por meio do teste t pareado. Foram consideradas significantes as diferenças em que $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Evolução ponderal Os pesos corporais médios estão na tabela 2.0 (abaixo). Nota-se que o MSG reduziu os pesos.

Tabela 2.0- Pesos corporais médios dos 4 grupos deste estudo.

<u>GRUPO</u>	<u>2 DIAS</u>	<u>14 DIAS</u>	<u>28 DIAS</u>	<u>56 DIAS</u>	<u>84 DIAS</u>	<u>112 DIAS</u>
MSG(n=12) Exercício	9,3±1,6	30,0±3,3*	72,1±8,9*	200,0±26,0*	290,0±37,1	344,2±40,8
Salina(n=7) Exercício	8,9±0,6	34,6±2,0	80,9±3,3	242,9±23,1	327,9±31,2	366,6±33,7
MSG(n=11) Sedentário	9,2±1,4	29,9±2,3*	71,7±9,5*	206,1±21,4*	276,6±44,6	328,9±45,3
Salina(n=6) Sedentário	9,3±1,3	33,9±1,8	81,4±6,1	258,1±12,4	344,7±13,9	362,7±43,1

Registro eletrofisiológico

Como pode ser visto (Figura 3), em todos os grupos, tanto sedentários quanto exercitados, observou-se uma maior dificuldade de propagação da DAC após a aplicação tópica do MSG, a julgar pela sua menor velocidade de propagação, tanto no ponto de registro 1 (MSG1) quanto no ponto 2 (MSG2). Nós observamos em um trabalho anterior que, aos 45-60 dias de idade, há uma redução significativa da velocidade de propagação da DAC em ratos exercitados, em comparação com controles sedentários que receberam tratamento prévio com solução salina (grupo Sal), ou sem tratamento (grupo ingênuo). Esse efeito do exercício também esteve presente nos grupos tratados com 2g/Kg e 4g/Kg MSG (injeções subcutâneas), como mostra a figura 4. Sendo assim, tais resultados demonstram que tanto a aplicação tópica de MSG na concentração de 50 mg/ml quanto o exercício físico dificultam a propagação da DAC. Curiosamente, este efeito da aplicação tópica de MSG foi oposto ao da aplicação sistêmica (tese da doutoranda Cássia Borges Lima), o que sugere mecanismos diferentes a depender da via de administração. Futuros experimentos são necessários para testar essa hipótese.

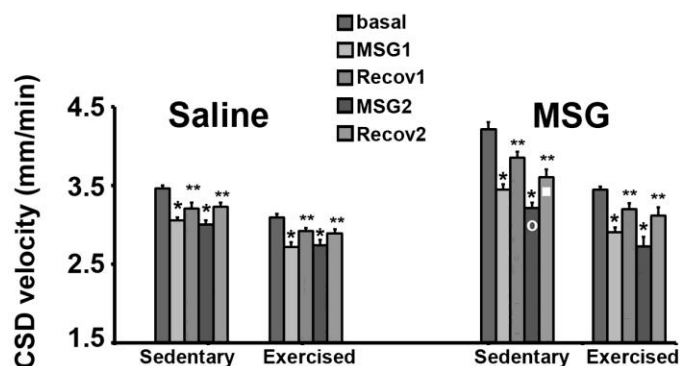
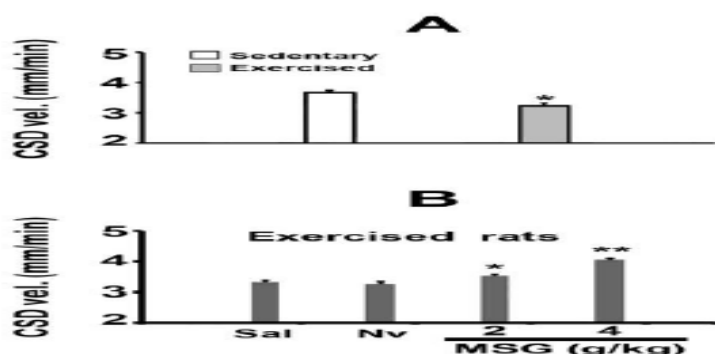


Figura 3: Redução das velocidades de propagação da DAC (média $\pm$ EPM) após a aplicação tópica de MSG durante o registro eletrofisiológico, em animais com 120-150 dias de idade, tratados previamente (no aleitamento) com solução salina ou MSG, e submetidos ao exercício em esteira por 3 semanas, ou mantidos sedentários. *indica valores significativamente diferentes em relação aos outros valores. **indica diferença em relação ao valor basal. O círculo branco indica diferença em relação ao valor da condição MSG1. O quadrado branco indica diferença em relação à condição “recuperação 1” (Recov1). $P < 0.05$, teste t pareado.



A, Velocidades da DAC de ratos sedentários e exercitados aos 45-60 dias. Mostrando uma redução significativa na velocidade de grupo exercitados. **B,** Velocidades de propagação da DAC de ratos exercitados aos 45- 60 dias. Sal, Nv, MSG-2 e MSG-4 são os grupos que receberam respectivamente salina, sem tratamento (grupo ingênuo), e 2 g / kg e 4 g / kg de MSG (injeção subcutânea). Os dados são expressos como (média $\pm$ EPM). Doze episódios da DAC foram deflagradas, em intervalos de 20 min, a partir da estimulação química por KCl, durante 4 horas de registro. * $P < 0,05$

DISCUSSÃO

Os nossos dados sugerem que o tratamento com o MSG no início da vida alterou negativamente o desenvolvimento do organismo. Eletrofisiologicamente, caracterizamos um novo efeito do MSG no cérebro de ratos em desenvolvimento. Em nosso trabalho anterior, aplicando MSG por via subcutânea em ratos no período pós-natal, demonstramos facilitação da propagação da DAC. Neste estudo, com animais mais idosos (120-150 dias), esses dados puderam ser confirmados comparando-se as velocidades basais (antes da aplicação tópica de MSG). Em contraste com o tratamento sistêmico, a aplicação tópica reduziu a propagação da

DAC, sugerindo que, a depender da via de administração (sistêmica ou tópica), bem como da idade (início da vida pós-natal ou idade adulta), os mecanismos de interação do MSG com o fenômeno da DAC são diferentes, levando a efeitos opostos. Isto nos motiva a investigar mais para esclarecer, por exemplo, se as alterações eletrofisiológicas induzidas pelo MSG são causadas por injúria cerebral ou pela expressão de mecanismos compensatórios contra essa lesão, como sugerido anteriormente (Ureña-Guerrero et al, 2003). Com relação ao exercício físico, nós confirmamos seus efeitos antagônicos sobre a DAC, previamente observados, e também demonstramos que ele pode interagir com o MSG, modificando a ação eletrofisiológica deste último. Nós sugerimos que essa interação pode refletir efeitos sobre a excitabilidade envolvendo a sua modulação via mecanismos glutamatérgicos e GABAérgicos. Como o exercício físico foi realizado no início da vida e os efeitos sobre a DAC foram demonstrados na idade adulta, postulamos que tais efeitos sejam permanentes ou, ao menos, duradouros. Assim eles sua ação benéfica sobre o sistema nervoso pode ter reflexos positivos no envelhecimento, como sugerido recentemente (Batista-de-Oliveira et al, 2012).

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a influência do exercício físico e da aplicação sistêmica via subcutânea e aplicação tópica do MSG sobre o sistema nervoso, a partir de mudanças no padrão da depressão alastrante cortical (DAC). As alterações observadas ocorreram na velocidade da DAC, a qual foi reduzida com o treinamento físico e com a aplicação tópica de MSG. Tais resultados contribuem para maior compreensão dos efeitos do exercício físico e da ação neurotóxica do glutamato monossódico sobre o cérebro, e traz maiores informações sobre o fenômeno da DAC.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Procad no. 131/2007), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe—IBPG no. 0085-2.07/09), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no. 4191) e Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT no. 573604/2008-8). R.C.A. Guedes é pesquisador CNPq (no. 301190/2010-0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A.A., Mendes-da-Silva, R.F. & Guedes, R.C.A. (2012)

Favorable and unfavorable lactation modulates the effects of electrical stimulation on brain excitability: a spreading depression study in adult rats. *Life Sci.*, 91:306-311

- Ganon WF (2005). Circulation through special organs. In: Review of medical physiology, chap32. McGraw-Hill, New York, 611- 630
- Guedes, R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition”. In: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin (eds.), Handbook of Behavior, Food and Nutrition, pp. 2343-2355 (2011). DOI 10.1007/978-0-387-92271-3_148, Springer Science+Business Media, LLC
- Kizer Js, Nemeroff Cb, Youngblood WW (1978). Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. Pharmacol Rev., 29(4):301-18.
- Leão, A.A.P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. Journal of Neurophysiology 10, 409-414. 1947
- Leão, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex..Journal of Neurophysiology 7, 359-390. 1944
- Lima CB, Soares GD, Vitor SM, Castellano B, Andrade da Costa BL, Guedes RC. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. Life Sci. 2013, in Prerss, doi: 10.1016/j.lfs.2013.07.009.
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. Ann N Y Acad Sci 1144:97-112
- Ureña-Guerrero ME, López-Pérez SJ, Beas-Zárate C. Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. Neurochem Int 2003; 42:269–276.

ANEXO 01: Parecer aprobatório do Comitê de ética em pesquisa

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, 31 de março de 2009

Ofício nº 127/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profº. Rubem Carlos Araújo Guedes**
Departamento de Nutrição
Processo nº 23076.002006/2009 -80

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Ação neurotóxica do glutamato monossódico sobre o cérebro de ratos em desenvolvimento: Avaliação eletrofisiológica da influência da atividade física.”*

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 CEEA-UFPE.

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

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

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen

Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Observação: Aluna: Cássia Borges Lima Bulhões Martins
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;
Animal: Ratos Wistar; Sexo: Machos; Idade: Entre 02 a 90 dias; Número de animais previsto no protocolo: 60 animais.

ANEXO 02: Comprovante de aceite do artigo 1

De: "Christine Kisthardt" <lifesci@email.arizona.edu>
Para: "guedes rca" <guedes.rca@gmail.com>, rguedes@ufpe.br
Enviadas: Quarta-feira, 10 de Julho de 2013 11:06:24
Assunto: Your Submission

Ref.: Ms. No. LFS-D-13-00267R1

Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex
Life Sciences

Dear Prof. Guedes,

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Life Sciences.

Your accepted manuscript will be sent to Elsevier for publication. Upon receipt of your article, the publisher will send you an acknowledgement letter with a copyright agreement and offprint order form.

Author proofs will be sent in .pdf format to the email address you have provided.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you deliver your message, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for your contribution to Life Sciences. We look forward to publishing future work from your laboratory.

Sincerely yours,

Loren E. Wold, Ph.D., F.A.H.A.
Editor-in-Chief
Life Sciences

ANEXO 03: Comprovante de submissão do artigo 2

----- Forwarded message -----

From: **Int. J. Developmental Neuroscience** <regino.perez-polo@utmb.edu>

Date: 2013/7/17

Subject: Submission Confirmation

To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Dear Rubem,

Your submission entitled "Treadmill exercise attenuates spreading depression, and increases cortical Iba1 immunoreactivity in normal and monosodium glutamate-treated developing rats." has been received by International Journal of Developmental Neuroscience

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dn/>. Your username is Your username is: guedes.rca@gmail.com.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/dn/automail_query.asp

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
International Journal of Developmental Neuroscience

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.