

Elían da Silva Francisco

**TRATAMENTO CRÔNICO COM TAURINA E ALANINA E
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL EM RATOS: EFEITOS
SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL**

**Recife
2015**

Elían da Silva Francisco

**TRATAMENTO CRÔNICO COM TAURINA E ALANINA E
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL EM RATOS: EFEITOS
SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL**

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

Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

**Recife
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F818t	Francisco, Elian da Silva. Tratamento crônico com taurina e alanina e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos sobre a depressão alaistrante cortical / Elian da Silva Francisco.– Recife: O autor, 2015. 73 f.: il.; tab.; 30 cm. Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015. Inclui referências e anexos. 1. Aminoácidos. 2. Sistema nervoso. 3. Depressão alaistrante da atividade elétrica cortical. 4. Desnutrição. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título. 612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-076)
-------	---

Elian da Silva Francisco

**TRATAMENTO CRÔNICO COM TAURINA E ALANINA E
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL EM RATOS: EFEITOS SOBRE A
DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL**

Dissertação aprovada em: 27 de fevereiro de 2015

Prof^a Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga / UFPB

Prof^a Ana Paula Rocha de Melo / UFPE

Prof^a Luciana Maria Seixas da Silva Maia / UFPE

**Recife
2015**

Dedico este trabalho aos meus pais *Laudecy* e *Mariano*, pelo amor incondicional durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a *Deus*, razão da minha existência, dando-me forças para prosseguir cada vez que aparecia um impedimento.

Aos meus queridos e amados pais *Laudecy* e *Mariano*, pelo exemplo, amor, carinho, dedicação, ensinamentos, paciência, força e incentivo.

Aos meus irmãos *Elizeu*, *Elisan*, *Eliatan* e *Elisafan*, cunhadas *Rubia*, *Patrícia* e *Rose* e sobrinhos *Ricardo* e *Eduarda*, por tudo o que representam em minha vida.

Aos meus *familiares e amigos*, pela amizade e compreensão em todas as minhas ausências para que eu pudesse concluir essa etapa.

Ao meu orientador Profº Dr *Rubem Guedes*, pela confiança, prontidão, paciência e conhecimentos repassados. A ele a minha sincera admiração e gratidão por sua inteira dedicação à Pesquisa e ao Ensino. Tenho muito a aprender, um grande exemplo a ser seguido, um Mestre.

Ao Profº Dr *Rubem Guedes* e Profª *Ana Paula*, que me orientaram durante os meus primeiros passos na iniciação científica.

As Professoras *Ângela Amâncio*, *Luciana Maia* e *Raquel Cruz*, pelo carinho ao me ensinar as técnicas quando entrei no LAFINNT como estagiária de Iniciação Científica. Carinho este que sinto até hoje.

A todos do LAFINNT *Andréia*, *Rosângela*, *Nora*, *Cássia*, *Regina*, *Paula*, *Suênia*, *Larissa*, Profª *Manuela* e Profº *Ricardo* e aos que passaram pelo laboratório durante esse período, pelo companheirismo, apoio tecnológico e intelectual, incentivo e amizade, sem os quais essa caminhada não teria o mesmo significado. A minha perseverança e confiança veio de cada um de vocês.

A *Thays* e *Mariana*, pela nossa amizade e companheirismo desde a graduação.

A *Denise*, pela amizade, paciência, conhecimentos transmitidos, e parceria nos experimentos. Sempre com muitas risadas.

As amigas do mestrado *Jéssica*, *Lanni*, *Amanda*, *Raquel* e *Cynthia*, pelos momentos inesquecíveis. Juntas trocamos ideias, dividimos trabalhos, tristezas e alegrias.

Ao Programa de PG em Nutrição e aos órgãos de fomento (CNPq, FACEPE, CAPES).

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

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

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Os aminoácidos taurina e alanina desempenham importantes papéis em vários processos fisiológicos no organismo. No sistema nervoso, influenciam a atividade elétrica do cérebro. Neste estudo, nós investigamos o efeito do tratamento crônico com taurina ou alanina ou ambos sobre o fenômeno cerebral dependente da excitabilidade conhecido como a depressão alastrante cortical (DAC). Para isso, utilizamos ratos jovens amamentados em condições normais e desfavoráveis (respectivamente ninhadas com 9 e 15 filhotes; grupos L₉ e L₁₅). Dos 7 aos 27 dias de vida pós-natal, os animais receberam, por gavagem, 300 mg/kg/d de taurina, ou alanina, ou ambos. Aos 33-35 dias, sob anestesia com uretana+cloralose, registramos a DAC e analisamos seus parâmetros (velocidade de propagação, amplitude e duração). Em comparação com os controles naïve- e tratados com água, os grupos tratados cronicamente com a taurina e/ou alanina exibiram reduzida velocidade da DAC ($p < 0,001$). Nenhum efeito aditivo foi observado nos grupos simultaneamente tratados com taurina e alanina. Este efeito de ambos os aminoácidos também foi encontrado em quatro grupos adicionais L₉ (naïve, água, taurina, e alanina) tratados na idade adulta (90-110 dias). A condição L₁₅ resultou em menores durações e velocidades mais elevadas da DAC em comparação com a condição L₉ e pareceu potenciar os efeitos dos aminoácidos na DAC. Estes dados são a primeira confirmação de que o tratamento crônico com taurina e/ou alanina desacelera a propagação da DAC, independentemente das condições de lactação (lactação normal *versus* desfavorável) ou da idade de administração dos aminoácidos (jovem *versus* adulto). Os resultados sugerem um papel inibitório para ambos os aminoácidos na atividade elétrica neuronal, o que merece investigação futura aprofundada dos mecanismos celulares, bioquímicos e eletrofisiológicos envolvidos, bem como da possível relação desses aminoácidos com desordens neurológicas relacionadas com a excitabilidade cerebral, como as epilepsias.

Palavras-chave: Aminoácidos. Sistema nervoso. Depressão alastrante da atividade elétrica cortical. Desnutrição.

ABSTRACT

The amino acids taurine and alanine play important roles in several physiological processes in the organism. In the nervous system, they influence the electrical activity of the brain. In this study, we investigated the effect of chronic treatment with taurine or alanine or both on the brain excitability-dependent phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). For this purpose we studied young rats suckled under normal and unfavorable conditions (respectively litters with 9 and 15 pups; groups L₉ and L₁₅). From postnatal days 7 to 27, the animals received per gavage 300 mg/kg/d of taurine or alanine or both. At 33–35 days, under urethane+chloralose anesthesia, we recorded CSD and analyzed its parameters (velocity of propagation, amplitude, and duration). Compared with naïve- and water-treated controls, the groups chronically treated with taurine and/or alanine displayed reduced velocity of CSD ($p < 0.001$). No additive effect was observed in the groups simultaneously treated with taurine and alanine. This effect of both amino acids was also found in four additional L₉ groups (naïve, water, taurine, and alanine) treated at adulthood (90–110 days). The L₁₅ condition resulted in smaller durations and higher CSD velocities compared with the L₉ condition and appeared to potentiate the effects of the amino acids on CSD. These data are the first confirmation that chronic treatment with taurine and/or alanine decelerates CSD propagation regardless of lactation conditions (normal *versus* unfavorable lactation) or age at amino acid administration (young *versus* adult). The results suggest an inhibitory role for both amino acids on neuronal electrical activity, which deserves further investigation of the cellular, biochemical and electrophysiological mechanisms involved, and the possible relationship of these amino acids with neurological disorders related to brain excitability, such as epilepsy.

Keywords Amino acids. Nervous system. Cortical spreading depression. Malnutrition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular da taurina	15
Figura 2. Síntese endógena da taurina	16
Figura 3. Estrutura molecular da alanina	20
Figura 4. Síntese endógena da alanina	21
Figura 5. Síntese do GABA a partir da alanina em neurônio GABAérgico	23
Figura 6. Comparação entre as etapas de desenvolvimento	24
Figura 7. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da DAC	26
Figura 8. Esquema dos grupos tratados no início da vida	33
Figura 9. Esquema dos grupos tratados na idade adulta	34
Figura 10. Esquema do registro eletrofisiológico da DAC	35

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Pesos corporais dos grupos estudados	43
Figura 2. Registros eletrofisiológicos dos animais jovens	45
Figura 3. Velocidade de propagação da DAC dos grupos estudados	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições que facilitam a propagação da DAC	27
Tabela 2. Condições que dificultam a propagação da DAC	28

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Amplitude da DAC	48
Tabela 2. Duração da DAC	49

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Alanine/Alanina
ANOVA	Análise de variância
CNS	Central nervous system
CSD	Cortical spreading depression
DAC	Depressão alastrante cortical
ECoG	Eletrocorticograma
EEG	Electroencephalogram/Eletroencefalograma
GABA	γ -aminobutyric acid/ácido γ -aminobutírico
i.p.	Intraperitoneal
L ₁₅	Unfavorable lactation/Lactação desfavorável
L ₉	Normal lactation/Lactação normal
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
Nv	Naïve/Ingênuo
SNC	Sistema nervoso central
T	Taurine/Taurina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
W	Water/Água

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Taurina	15
2.2 Taurina e sistema nervoso	18
2.3 Alanina	20
2.4 Alanina e sistema nervoso	22
2.5 Desnutrição e sistema nervoso	23
2.6 Depressão alastrante cortical	25
3. HIPÓTESES	30
4 OBETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5 MÉTODOS	32
5.1 Animais	32
5.2 Tratamento com taurina e alanina no início da vida (jovens)	33
5.3 Tratamento com taurina e alanina na idade adulta (adultos)	33
5.4 Determinação do peso corporal	34
5.5 Registro da depressão alastrante cortical	34
5.6 Eutanásia	35
5.7 Análise estatística	35
6 RESULTADOS - Artigo Original	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
7.1 Perspectivas	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXO - A	72
ANEXO – B	73

1 APRESENTAÇÃO

Os aminoácidos taurina e alanina são muito abundantes em mamíferos e evidências experimentais relatam o envolvimento desses aminoácidos em vários processos fisiológicos no organismo (SCHOUSBOE et al., 2003; WU e PRENTICE, 2010). Estudos anteriores têm demonstrado o possível envolvimento desses aminoácidos no fino equilíbrio entre os mecanismos excitatórios e inibitórios dentro do cérebro (OJA e SARANSAARI, 2013; SCHOUSBOE et al., 2003). Entretanto, taurina e a alanina são aminoácidos cujos aspectos eletrofisiológicos não são totalmente conhecidos.

A desnutrição é um problema de ordem mundial que afeta milhões de recém nascidos e crianças durante o período de maior vulnerabilidade de desenvolvimento do encéfalo (MORGANE et al., 2002) capaz de alterar a atividade elétrica das células neuronais (ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Os efeitos eletrofisiológicos provocados por alterações nutricionais podem ser observados através do estudo da atividade elétrica cerebral, com o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC), que está relacionada com a excitabilidade do cérebro.

Com relação ao papel dos aminoácidos sobre a excitabilidade cerebral, alguns trabalhos experimentais desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) têm demonstrado que na fase de período crítico do desenvolvimento do cérebro, o tratamento crônico com os aminoácidos L-arginina (MAIA et al., 2009) e L-glutamina (LIMA et al., 2009) pode alterar a susceptibilidade neuronal a propagação do fenômeno da DAC.

A importância da taurina e alanina no SNC e a ausência de informação na literatura sobre a influência destes aminoácidos sobre a DAC nos direcionou a presente dissertação. Os resultados estão descritos em artigo original intitulado *Neonatal taurine and alanine decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litters sizes* (submetido à publicação – Anexo A). O presente artigo teve por objetivo auxiliar na compreensão dos efeitos neurais da administração crônica dos aminoácidos taurina e alanina sobre o fenômeno da DAC no córtex cerebral de ratos jovens, amamentados sob condição normal e desfavorável de lactação. Adicionalmente, comparamos os efeitos de quatro grupos tratado no início da vida com respectivos grupos tratados na idade adulta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taurina

O ácido 2-aminoetano sulfônico, taurina (Figura 1), foi descoberto em 1827, isolado na bile de bovinos (*Bos Taurus*), de onde deriva seu nome (HUXTABLE, 1992). É um aminoácido não observado como constituinte proteico, mas antes se encontra na forma livre ou de simples peptídeos (BIRDSALL, 1998). Em muitos animais, incluindo os mamíferos, é um dos mais abundantes constituintes orgânicos de baixo peso molecular (STAPLETON et al., 1998). Encontrado livremente no líquido intracelular de tecidos eletricamente excitáveis e estruturas secretoras. É um dos aminoácidos livres mais abundantes em leucócitos, músculo esquelético, coração, medula espinhal, retina e cérebro (HUXTABLE, 1992; RIPPS e SHEN, 2012).

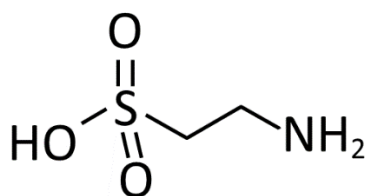


Figura 1. Estrutura molecular da taurina. Adaptada de Ripps & Shen, 2012.

No organismo, a taurina pode ser sintetizada ou obtida através da dieta pelo consumo de produtos de origem animal - como carnes, vísceras e frutos do mar. Alimentos de origem vegetal são pobres como fonte desse nutriente (RANA e SANDERS, 1986). A taurina é resultado do metabolismo dos aminoácidos metionina e cisteína, por uma cadeia de reações enzimáticas de oxidação e transulfuração. Três vias requerem a participação da piridoxal-5-fosfato (P5P), que utiliza a vitamina B6 como cofator. Essas reações envolvem as enzimas cistationina sintase, cistationase e cisteína sulfinato descarboxilase (HUXABLE, 1992; BIRDSAL, 1998).

No curso de biosíntese da taurina, a cisteína pode ser obtida pela dieta ou a partir da metionina hepática através de uma reação de transulfuração pela ação da enzima cistationina sintase. Em sequência, a cisteína é oxidada a sulfinato de cisteína pela enzima cisteína desoxigenase (JACOBSEN e SMITH, 1968). O sulfinato pode ser descarboxilado originando a hipotaurina, por ação da enzima cisteína sulfinato descarboxilase ou metabolizada a sulfato, que é excretado pela urina. Como etapa final da síntese, temos a hipotaurina desidrogenase promovendo a oxidação da hipotaurina, tendo como produto final a taurina. A atividade da

enzima cisteína sulfinato descarboxilase determina a capacidade de síntese de taurina (BIRDSAL, 1998). O principal órgão envolvido na síntese de taurina é o fígado (Figura 2; RASGADO-FLORES et al., 2012).

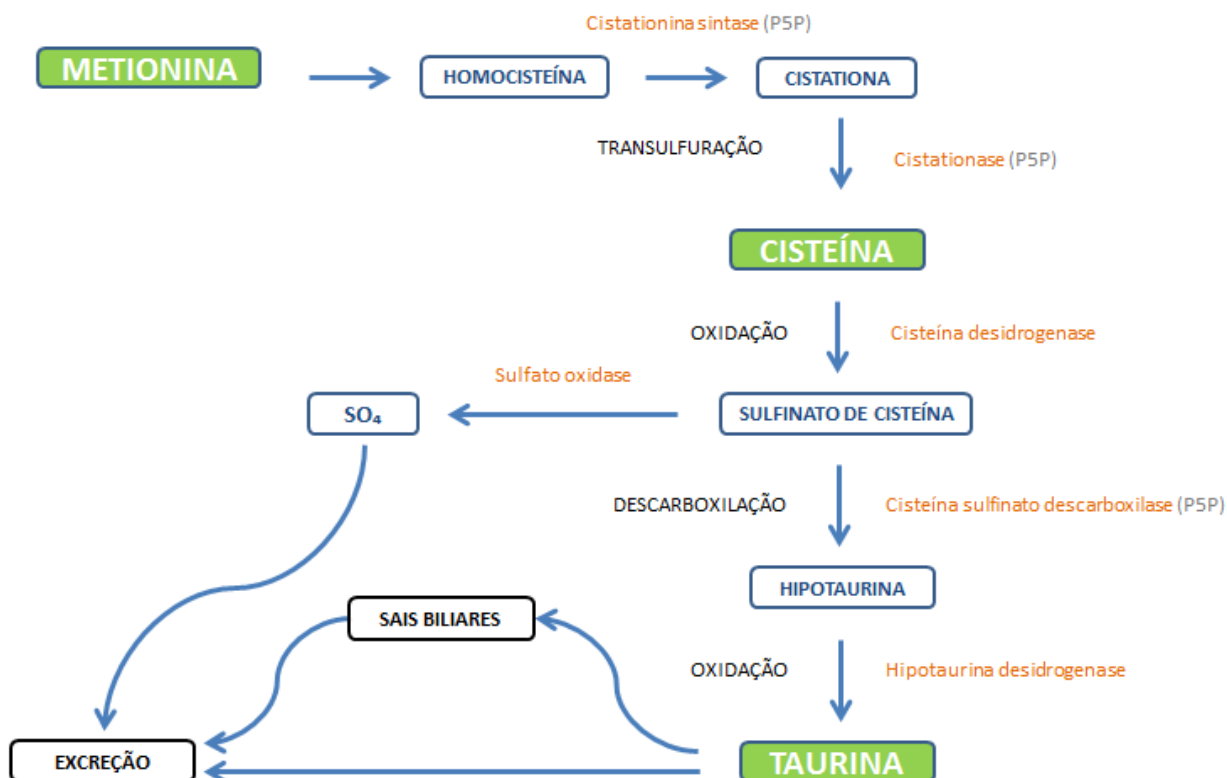


Figura 2. Síntese da taurina. Adaptada de Huxtable (1992) e Birdsall (1998).

A capacidade de biossíntese da taurina pode variar entre as espécies e são baixas em primatas, como os seres humanos. Estudo comparativo relatou que a velocidade de síntese em humanos é menor que àquelas encontradas em roedores. Essa menor eficiência foi associada a atividade reduzida da cisteína sulfinato descarboxilase, enzima considerada limitante na biossíntese da taurina no fígado (RANA e SANDERS, 1986). A presença desta enzima foi demonstrada em outros tecidos; dentre eles, merece destaque o cérebro, onde foi encontrada no interior de células gliais (RIPPS e SHEN, 2012).

A taurina formada no fígado, assim como a advinda de fontes alimentares, é exportada para outros órgãos com baixas capacidades de sintetizar taurina (PASSANTES-MORALES e HERNÁNDEZ-BENÍTEZ, 2010). Devido a sua natureza bioquímica, possui lenta difusão através das membranas biológicas quando comparada com aminoácidos carboxílicos (HUXTABLE, 1992). Na membrana celular, a captação é feita pelo transportador de taurina (TauT), dependente de íons Na^+ e Cl^- , específico para β -aminoácidos, com baixa afinidade e

alta capacidade. O TauT é expresso numa grande variedade de células e tecidos, inclusive no cérebro (PASSANTES-MORALES e HERNÁNDEZ-BENÍTEZ, 2010).

É de conhecimento geral que os níveis de taurina circulante são controlados pelos rins, por onde acontece sua principal excreção (JACOBSEN e SMITH, 1968). Dados indicam que qualquer excesso é rapidamente eliminado através dos rins e que a manutenção desse equilíbrio não depende do sexo. Estudo realizado em ratos adultos (machos e fêmeas) demonstrou que administração, via gavagem, de 30 e 300mg/Kg de taurina foi rapidamente absorvida e distribuída para os tecidos e excretada de forma inalterada na urina. Num período de 6 horas os níveis plasmáticos e teciduais já estavam normalizados (SVED et al., 2007). Segundo Jacobsen e Smith (1968), essa excreção pode aumentar em decorrência de estresse, trauma, alcoolismo, doença muscular e intestinal, queimadura, envelhecimento e deficiência de micronutrientes, dentre outras.

A taurina é essencial ao desenvolvimento de mamíferos. Estudos *in vitro* e em várias espécies demonstraram que o baixo nível de taurina está relacionado a várias lesões patológicas, como cardiomiopatia, degeneração da retina e atraso no crescimento. Essas lesões são evidenciadas, principalmente, se a deficiência de taurina ocorrer durante a fase crítica de desenvolvimento (BIRDSALL, 1998). Em camundongos nocaute para o TauT foi observada redução nos níveis de taurina associado a redução da fertilidade e perda da visão, devido a degeneração apoptótica grave da retina (SCHULLER-LEVIS e PARQUE, 2003).

A taurina é um aminoácido amplamente distribuído no organismo. Envolvido em diversos processos fisiológicos, participa na conjugação de ácidos biliares, osmorregulação e modulação dos níveis de cálcio intracelular (RIPPS e SHEN, 2012). Administrada de forma terapêutica, a taurina possui uma série de propriedades citoprotetoras através de sua ação como molécula antioxidante (GREEN et al., 1995), antidiabética (TRACHTMAN et al., 1995), antihipertensiva (DAWSON et al., 2000; ROYSOMMUTI e WYSS, 2014), hepatoprotetora (DOGRU-ABBASOGLU et al., 2001) e neuroprotetora em injúria cerebral (TARANUKHIN et al., 2009). Além disso, parece suavizar sintomas na epilepsia (OJA e SARANSAARI, 2013) e prevenir apoptose em isquemia induzida (TARANUKHIN et al., 2008).

Clinicamente, a taurina tem sido utilizada com vários graus de sucesso no tratamento de uma ampla variedade de condições, como doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, fibrose cística, degeneração macular, doença de Alzheimer, distúrbios hepáticos, alcoolismo, epilepsia e outros distúrbios convulsivos (BIRDSALL, 1998).

2.2 Taurina e sistema nervoso

A taurina, foi por longo tempo, considerada apenas um produto residual inerte, resultado do metabolismo de aminoácidos sulfurados em animais. Bioquimicamente inerte, no sentido de que a maior parte da taurina circulante no organismo é excretada inalterada (HUXTABLE, 1992). Apenas em 1975, a taurina foi considerada importante para alimentação humana, ao se notar que lactentes prematuros alimentados por nutrição parenteral total não conseguiam manter os níveis plasmáticos e urinários de taurina comparados a lactentes com aleitamento materno (BIRDSALL, 1998). Estudo realizado por Agostoni et al (2000) reforça a importância desse aminoácido para o desenvolvimento do SNC ao constatar a presença de alta quantidade de taurina no leite materno, sendo o segundo mais abundante aminoácido livre depois do glutamato.

A taurina está presente em alta quantidade e em várias áreas do SNC (RIPPS e SHEN, 2012). As maiores concentrações de taurina ocorrem no cérebro em desenvolvimento, fase em que as concentrações de outros aminoácidos se encontram mais baixas. Com o desenvolvimento, as concentrações de taurina diminuem, com níveis em adultos três vezes menor que em neonatos (HUXTABLE, 1992). Exceção acontece no bulbo olfatório, onde os altos níveis de taurina são observados também em adultos (PASSANTES-MORALES e HERNÁNDEZ-BENÍTEZ, 2010).

Rasgado-Flores et al (2012), através de estudo *in vitro* em micro vasos de encéfalo bovino, caracterizou o sistema de transporte da taurina através da barreira hematoencefálica (BHE). O transporte facilitado da taurina foi demonstrado presente em ambas as membranas que compõe a BHE, membrana luminal (voltada para o sangue) e membrana abluminal (voltada para o fluido intersticial do encéfalo). O transporte facilitado se mostrou predominante na membrana luminal. Já o transporte dependente de Na^+ foi demonstrado estar presente apenas na membrana abluminal, sendo necessário 2 íons Na^+ /1 molécula de taurina transportada. O transporte de taurina dependente de Na^+ é sensível ao potencial de membrana, sendo inibido por despolarização e ativado por hiperpolarização. Em estudo anterior, Tamai et al (1995), descreveram uma estequiometria diferente para o transporte da taurina com necessidade de 2 íons Na^+ + 1 íon Cl^- /1 molécula de taurina transportada.

Estudos no SNC de roedores têm demonstrado associação entre a suplementação de taurina e aumento de seus níveis neurais, bem como alterações nas concentrações de outros aminoácidos e neurotransmissores. Murakami e Furuse (2010) relataram que animais adultos tratados cronicamente com taurina apresentavam concentrações aumentadas desse aminoácido

e L-arginina no hipotálamo. A aplicação de taurina (0,25, 0,5 e 1 g/kg, i.p.) conduziu a aumentos graduais nas concentrações de taurina no hipocampo e corpo estriado. Além de alterações nas concentrações de glutamato, glutamina, alanina e GABA em ambas as regiões do cérebro (MOLCHANOVA et al., 2007). Além disso, o tratamento com taurina alterou as concentrações de noradrenalina e dopamina no hipotálamo (PANULA-LEHTO et al., 1992) e de dopamina no núcleo accumbens (ERICSON et al., 2006).

Durante o desenvolvimento do SNC, a taurina atua como um fator trófico (CHEN et al., 1998), e participa ativamente na homeostase desse sistema, funcionamento e regulação da pressão osmótica, processos de neuromodulação e neurotransmissão inibitória (RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2009; WU et al., 2005; WU e PRENTICE, 2010). Oja e Saransaari (1991) mostraram resultados que reforçam a ação da taurina como reguladora da atividade neuronal do SNC em desenvolvimento. Eles demonstraram que a ativação de receptores para aminoácidos excitatórios modula a liberação de taurina mais efetivamente durante o desenvolvimento que em cérebro de ratos adultos.

A ação da taurina como um regulador da excitabilidade e atividade neuronal tem sido demonstrada tanto por estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Estudo *in vitro* realizado por Jia et al (2008) demonstrou a capacidade da taurina em reduzir a excitabilidade em neurônios de retransmissão talamocorticais e ativar receptores extrasinápticos gabaérgicos e glicinérgicos em neurônios ventrobaisais no tálamo de camundongos. Adicionalmente, estudo *in vivo*, descreveu um papel fisiológico importante no controle da função do núcleo accumbens pela taurina durante o desenvolvimento do SNC. (JIANG et al., 2004).

A taurina é um análogo estrutural do transmissor inibitório GABA, sendo reconhecida como um dos mais importantes aminoácidos inibitórios distribuídos neste tecido (RIPPS e SHEN, 2012). A diminuição na concentração cerebral de taurina pode aumentar a excitabilidade geral de populações neuronais e, assim, contribuir para o início de convulsões. Em estudos com modelos que mimetizam as epilepsias, a taurina, têm se mostrado importante no estabelecimento do equilíbrio entre os processos inibitórios e excitatório no cérebro (OJA e SARANSAARI, 2013).

Em animais de laboratório, tem-se atribuído à taurina um papel de neuroproteção contra o acidente vascular cerebral experimental (SUN et al., 2012), hipóxia, neurotoxicidade induzida por glutamato, e inflamação (EL IDRISSEI, 2008; PAN et al., 2010). Estudos demonstraram a liberação de taurina no tecido nervoso em diversas condições de dano celular, sendo também observada sua liberação durante o fenômeno da DAC desencadeado pela aplicação de K⁺, aplicação de NMDA (N-metil D-Aspartato) ou indução de infarto trombótico (SHCELLER,

2000). No entanto, nada se sabe acerca da relação inversa, isto é, se - e como - a modificação dos níveis de taurina no organismo influenciaria a susceptibilidade cerebral à DAC.

2.3 Alanina

Alanina (ácido 2-aminopropiônico) é o segundo membro da série de aminoácidos simples com um pequeno esqueleto de hidrocarboneto. Existe naturalmente sob duas formas isoméricas, D- e L-alanina, sendo o isômero D encontrado apenas nas paredes celulares de bactérias e alguns peptídeos. A alanina (Figura 3) é um α -aminoácido considerado nutricionalmente não essencial envolvido na síntese proteica e na obtenção de energia (RODWELL, 2003).

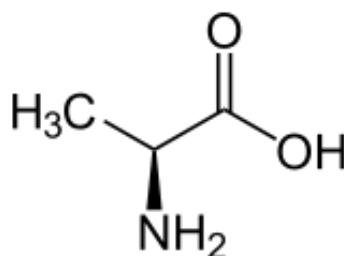


Figura 3. Estrutura molecular da alanina. Adaptada de Tiedje et al., 2010.

No organismo, a alanina é comumente sintetizada a partir do piruvato em uma grande variedade de tecidos, incluindo músculos, cérebro e fígado, sendo neste último a síntese mais representativa. A enzima limitante é a alanina aminotransferase, responsável pela aminação do piruvato. No processo de transaminação o aminoácido glutamato participa como principal fonte endógena da alanina, doando seu grupamento amina (NH_3^+), resultando em α -cetoglutarato (RODWELL, 2003). Em quantidade reduzidas, a alanina também pode ser proveniente do metabolismo do aspartato, triptofano, 3-sulfino-L-alanina, selenocisteína e timina. Essas reações envolvem enzimas que utilizam a P5P (KOHLMEIER, 2003). Na Figura 4, esquema simplificado das fontes endógenas de alanina.

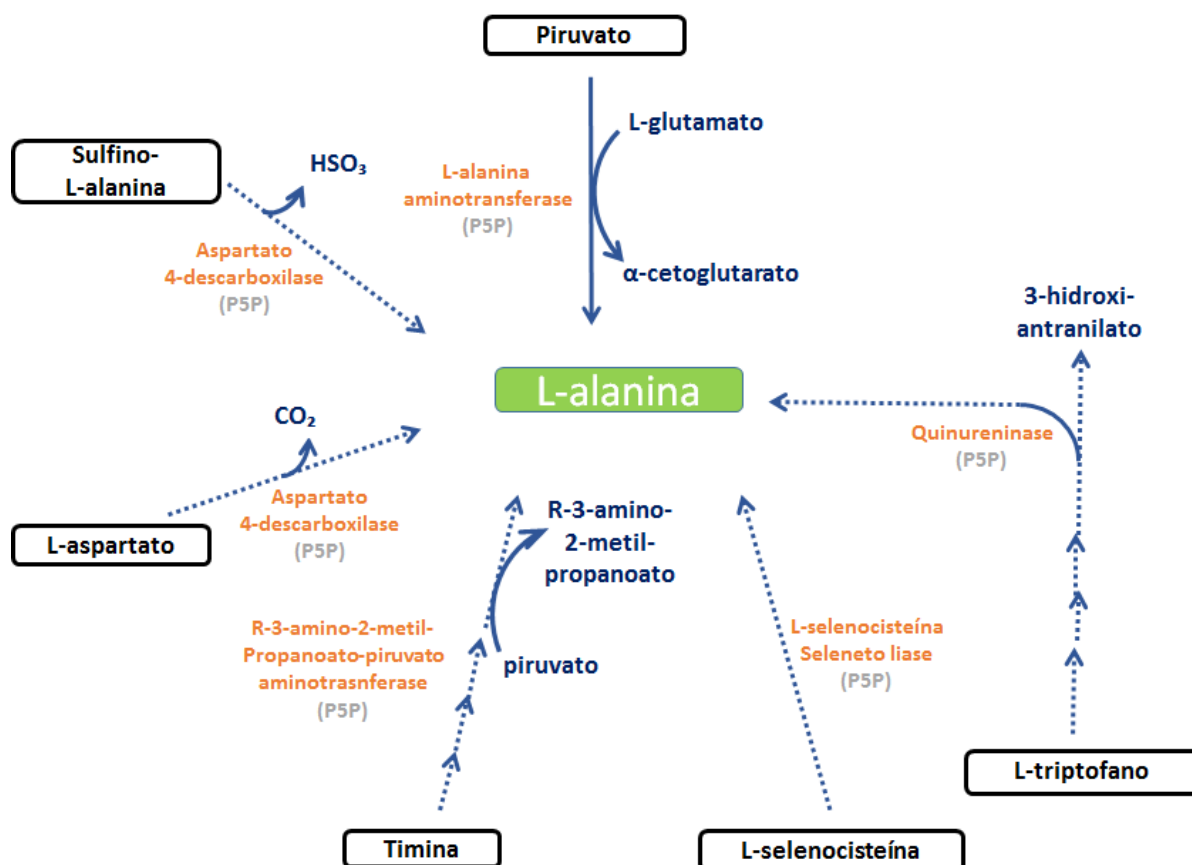


Figura 4. Síntese endógena de alanina. Adaptada de Kohlmeier, 2003.

Amplamente distribuída no organismo, a alanina exerce diversas funções. Como as reações de transaminação do piruvato são reversíveis, a alanina possui uma relação estreita com as vias metabólicas da glicólise, gliconeogênese e do ácido tricarboxílico (SCHOUSBOE et al., 2003). A alanina também participa do ciclo glicose-alanina, transportando o grupamento amino dos aminoácidos do músculo para o fígado, participando assim na remoção da amônia através da síntese da ureia (RODWELL, 2003).

O aminoácido alanina tem sido relatado como molécula citoprotetora contra lesões induzidas pelos radicais livres em diversos tecidos (DADSETAN et al., 2013; ESTACION et al., 2003). Um dos possíveis mecanismos que podem explicar o papel desse aminoácido foi estudado por Grosser et al. (2004). Esses autores constataram que a L-alanina em concentrações fisiológicas estimula a expressão, bem como a atividade enzimática de proteínas com propriedades antioxidantes como a heme-oxigenase-1 e ferritina em células endoteliais.

A suplementação de alanina pode levar a alterações nos níveis plasmáticos e cerebrais deste aminoácido. Nägeli et al (2014) constataram que a infusão intravenosa de 0,75g de L-

alanina-L-glutamina em pacientes com lesão cerebral resulta em aumento dos níveis de alanina no SNC.

2.4 Alanina e sistema nervoso

Além de participar no fornecimento de energia através do processo de transaminação do piruvato, a alanina está envolvida em processos de biossíntese molecular (WESTERGAARD et al. 1993). Em mamíferos, incluindo o homem, a alanina pode ser utilizada para síntese de glutamato e glutamina (WAAGEPETERSEN et al., 2000), aspartato (RODWELL, 2003) e ácido γ -aminobutírico (GABA; SCHOUSBOE et al. 2003).

A alanina também desempenha outros e diferentes papéis nos neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (SCHOUSBOE et al., 2003). Westergaard et al (1993) mostraram que tanto neurônios glutamatérgicos como GABAérgicos possuem igual capacidade para absorção de alanina, no entanto neurônios glutamatérgicos liberam nove vezes mais alanina que os neurônios GABAérgicos. Em neurônios glutamatérgicos a demanda na síntese do glutamato a partir de glutamina produz uma grande quantidade de amoníaco e alanina pode servir como um portador de nitrogênio amoniacal do compartimento neuronal para o compartimento dos astrócitos (WAAGEPETERSEN et al., 2000).

A atividade enzimática da alanina aminotransferase é relativamente modesta em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos quando comparado aos astrócitos. Considerando o exposto, é razoável presumir que o papel da alanina como precursora de glutamato parece representar uma via de menor importância para a manutenção das concentrações desse neurotransmissor (WESTERGAARD et al., 1993).

Os neurônios GABAérgicos expressam toda a maquinaria enzimática necessária para a reação metabólica, constituindo o GABA shunt. Neste, alanina e glutamato podem ser utilizados como um combustível metabólico para a síntese de GABA. A alanina doa o grupamento amino para o α -cetoglutarato originando o glutamato que sofre descarboxilação pela glutamato descarboxilase, resultando em GABA (SCHOUSBOE et al., 2003) – Figura 5.

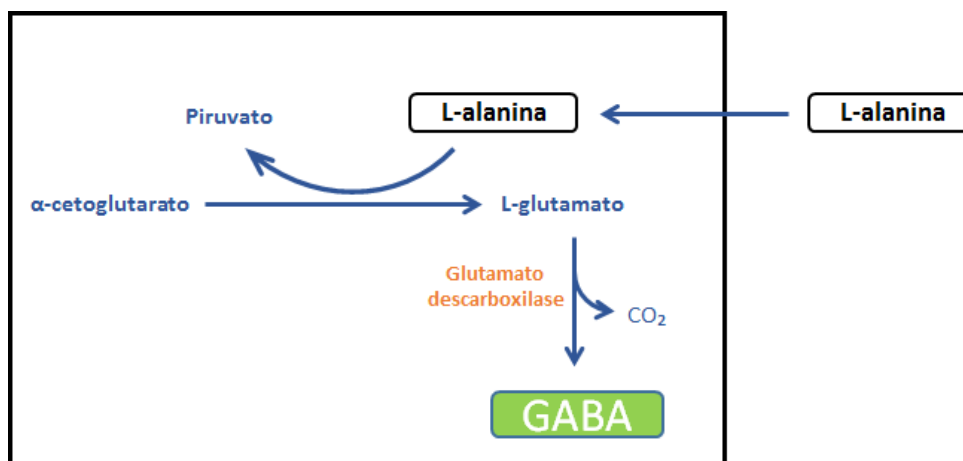


Figura 5. Síntese do GABA a partir da alanina em neurônio GABAérgico. Adaptada de Schousboe et al., 2003.

2.5 Desnutrição e sistema nervoso

A nutrição é o processo biológico por meio do qual os organismos vivos assimilam os nutrientes indispensáveis à realização de suas funções vitais (MORGANE et al., 1993). Em mamíferos, uma nutrição adequada está relacionada com a prevenção de doenças crônicas e manutenção de uma boa qualidade de vida do indivíduo. Muitos problemas de saúde pública possuem relação com o estado nutricional (BENTON et al., 2008). Com relação ao sistema nervoso, uma assimilação adequada de nutrientes, particularmente no início da vida, é um dos principais fatores não genéticos capazes de influenciar positivamente o cérebro em desenvolvimento (MORGANE et al., 2002).

No início da vida o sistema nervoso (SN) tem seu crescimento e desenvolvimento acontecendo intensamente. Processos como a hiperplasia (aumento da quantidade de células nervosas), a hipertrofia (aumento do seu tamanho), a mielinização e a organização das sinapses são fundamentais para o desenvolvimento neural. A formação de mielina nas fibras nervosas (mielinização) e uma boa rede de pontos de comunicação entre os neurônios (organização sináptica) são essenciais para a transmissão eficiente das informações contidas nos impulsos elétricos neuronais (MORGANE et al., 1978; 1993).

Esses processos encontram-se intensificados no chamado “período crítico de desenvolvimento” ou “período de crescimento rápido do cérebro”. No homem, essa fase de maior vulnerabilidade, inicia-se no terceiro trimestre gestacional e segue até os primeiros dois a quatro anos de vida. No rato (o modelo animal mais utilizado para esses estudos), esse período equivale às três primeiras semanas de vida pós-natal, coincidindo com o período de aleitamento (Figura 6; MORGANE et al., 1993).

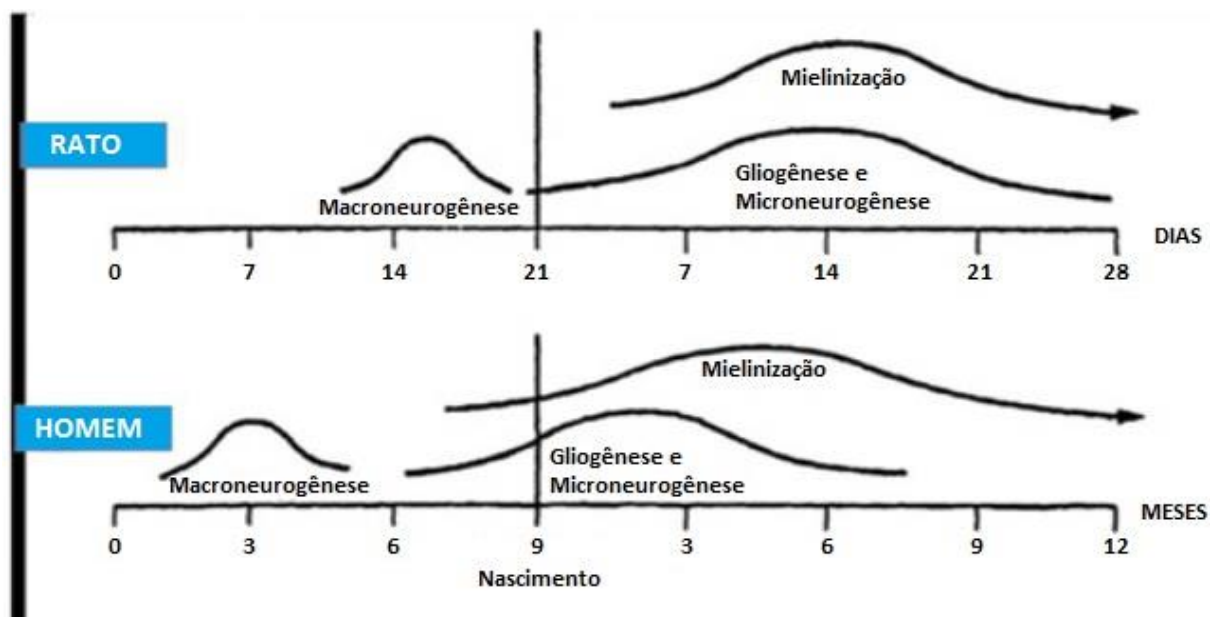


Figura 6. Comparação entre as etapas de desenvolvimento do sistema nervoso no homem e no rato, incluindo as fases pré e pós-natal. Adaptada de Morgane et al., 1993.

Apesar dos índices crescentes de obesidade em todo o mundo, a desnutrição, principalmente na infância, continua a ser um grave problema de saúde enfrentado por países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, especialmente as regiões Norte e Nordeste do país (BATISTA-FILHO e RISSIN, 2003; OLIVEIRA et al., 2006). A desnutrição, no período perinatal, pode modificar negativamente parâmetros estruturais, bioquímicos, e eletrofisiológicos do cérebro, e esses efeitos podem durar eventualmente até a vida adulta (MORGANE et al., 1978; FRAZÃO et al., 2008; GUEDES, 2011).

Estudos, em humanos e animais, consolidam a influência do fator nutricional sobre a estrutura e funcionamento cerebral e sua importância para a saúde, desenvolvimento de doenças e sobrevivência. O impacto neural do insulto nutricional pode ser mais ou menos severo, a depender da etapa do desenvolvimento em que ele incide, bem como da sua intensidade e duração (GUEDES, 2011).

A inadequação nutricional continua a ser um dos principais fatores não genéticos que afetam o cérebro em desenvolvimento (ALAMY e BENGELLOUN, 2012). O termo desnutrição implica que um ou mais nutrientes estão ausentes ou em proporções erradas. Diferentemente, mas também prejudicial, na subnutrição todos os elementos requeridos estariam disponíveis na dieta, mas em quantidades insuficientes (MORGANE et al., 2002). A subnutrição, pode ser induzida experimentalmente através do emprego de alguns modelos experimentais, tais como: grande número de filhotes por ninhada; restrição dos filhotes à

presença materna; ou redução na quantidade de dieta ofertada (ALAMY e BENGELLOUN, 2012).

Ninhadas formadas por uma grande quantidade de filhotes aumentam a competição pelo leite materno, resultando em desnutrição moderada a grave (HERNANDES et al., 2005; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Esta condição pode influenciar o desenvolvimento do SNC, alterando-o do ponto de vista eletrofisiológico, o que pode ser estudado por meio do fenômeno da DAC (BATISTA DE OLIVEIRA et al., 2012; MENDES-DA-SILVA et al., 2014).

2.6 Depressão Alastrante Cortical

A DAC é um fenômeno neural que está relacionado com a excitabilidade do cérebro. Foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador brasileiro Aristides Leão em 1944, quando realizava estudos sobre “epilepsia experimental” na superfície do córtex cerebral de coelhos anestesiados. Inicialmente, Leão constatou que estímulos elétricos, químicos ou mecânicos locais (aplicados em um ponto do córtex) são capazes de provocar uma resposta caracterizada por acentuada redução (depressão) da atividade elétrica espontânea do ponto cortical estimulado. Essa depressão dura alguns minutos e se propaga (alastra) lentamente (velocidades da ordem de poucos mm/min) de forma concêntrica por todo o córtex. À medida que o fenômeno se propaga para regiões corticais cada vez mais afastadas do ponto onde se originou, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir desse ponto, também de forma concêntrica e ao final de cerca de 10 a 15 minutos todo o tecido encontra-se recuperado (LEÃO, 1944a).

Durante a DAC, simultaneamente à depressão da atividade elétrica espontânea, é observada uma variação lenta de voltagem (VLV) na região cortical na qual o fenômeno está ocorrendo. O córtex torna-se negativo em relação a um ponto de voltagem fixa. Essa variação negativa, de amplitude entre 5 e 20mV, é geralmente seguida e ocasionalmente precedida de uma fase positiva de menor amplitude (LEÃO, 1951). Além das citadas, várias outras modificações ocorrem, como dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944b), alterações das concentrações de certos aminoácidos como taurina e glutamato a nível extracelular (SCHELLER et al., 2000), aumento na quantidade de água e alterações das concentrações de íons (HANSEN e OLSEN, 1980; SCHELLER et al., 2000), dentre outros. Todas essas modificações são reversíveis (Figura 7).

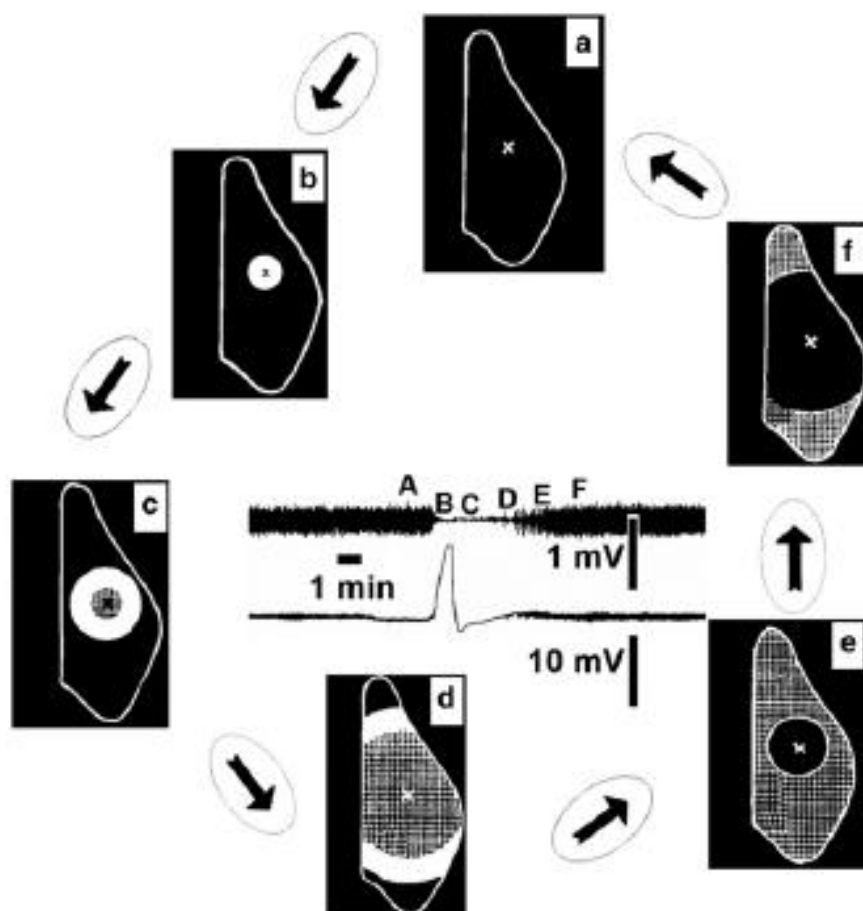


Figura 7. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC; adaptado de Guedes, 2011). Em “a”, um córtex normal e nele o ponto estimulado (x), iniciando a DAC. Na sequência, indicada pelas setas, “b” a “d”, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, “c” a “f” indicam regiões que já sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). De “b” a “f”, observa-se que propagação (área branca) e recuperação (área escura) dão-se de forma concêntrica, sendo o ponto inicialmente estimulado o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente em “a” todo o tecido se mostra completamente recuperado, retornando à condição inicial. No centro da figura, um traçado de registro demonstrando o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV), a qual sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F” correspondem a sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

A DAC foi demonstrada em várias espécies de animais (BUREŠ et al., 1974), incluindo o homem (MAYEVSKY et al., 1996). Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado relação do fenômeno da DAC com desordens na excitabilidade cerebral e suas doenças, como enxaqueca com aura (FERRARI et al., 2015), esclerose múltipla (PUSIC et al., 2015) e epilepsia (FABRICIUS et al., 2008; WEI et al., 2014).

O fenômeno da DAC vem sendo utilizado pelo LAFINNT como modelo experimental para avaliar o bom funcionamento do tecido neural. No LAFINNT, tem-se demonstrado que algumas condições nutricionais, hormonais, ambientais e farmacológicas podem modificar a

suscetibilidade cortical ao fenômeno da DAC, algumas dificultando, e outras, facilitando sua propagação. As tabelas 1 e 2 listam algumas das condições, disponíveis na literatura, envolvidas na alteração da excitabilidade cortical à DAC, seja facilitando ou dificultando sua propagação.

Tabela 1: Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor, Ano
Redução do cloreto extracelular	GUEDES e DO CARMO, 1980
Diazepam	GUEDES et al., 1992
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001
Privação do sono paradoxal	VASCONCELOS et al., 2004
Condição desfavorável de lactação	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Etanol (crônico)	ABADIE-GUEDES et al., 2008;
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 ácido ascórbico (60 ou 120 mg/Kg/d)	MONTE-GUEDES et al., 2011; MENDES-DA-SILVA et al., 2014
Tratamento com o antagonista serotoninérgico Tianeptina	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013
Tratamento com glutamato monossódico	LIMA et al., 2013
Dexametasona	LOPES-DE-MORAIS et al., 2014

*Dieta Básica Regional

Tabela 2. 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
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	COSTA-CRUZ et al., 2006
Estimulação ambiental	SANTOS-MONTEIRO et al., 2000
Ativação do sistema serotoninérgico	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Pilocarpina (doses subconvulsivantes)	GUEDES e VASCONCELOS et al., 2008
Tratamento de ratos adultos 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
Dieta hiperlipídica	GERMANO et al., 2013
Tratamento com o antagonista de opioides Naloxona	GUEDES et al., 2013
Tratamento crônico com 30mg/Kg/d de ácido ascórbico	MENDES-DA-SILVA et al., 2014

A desnutrição, seja por manipulação da dieta ou do tamanho da ninhada, facilita a propagação da DAC (GUEDES et al., 2013; LIMA et al., 2009; MENDES-DA-SILVA et al, 2014; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Estudos em roedores têm demonstrado que a ingestão insuficiente de nutrientes, especialmente se no início da vida, fase crítica do desenvolvimento do SNC, modifica a ação de certos compostos no cérebro, aumentando ou diminuindo as respostas ao fenômeno da DAC. Em animais com o estado nutricional comprometido, a pilocarpina (Vasconcelos et al., 2004), a dipirona (Amaral et al. 2009) e o lítio (De Aguiar et al. 2011) alteram a DAC mais intensamente do que o fazem

em animais bem-nutridos. Outros compostos, como o citalopram (Guedes et al., 2002), a fluoxetina (Amâncio-dos-Santos et al., 2006) e a glutamina (Lima et al. 2009) influenciam a DAC de forma semelhante em animais nutridos e desnutridos. Por outro lado, o diazepam (Guedes et al., 1992), a glicose (Costa Cruz e Guedes 2001), a L-arginina (Frazão et al., 2008), a tianeptina (Amâncio-Santos et al. 2013), e o antagonista de opióides naloxona (Guedes et al. 2013) afetam a DAC de forma menos intensa em animais desnutridos do que em bem-nutridos.

Com relação ao papel de aminoácidos sobre a propagação do fenômeno da DAC, a suplementação crônica, durante a fase de maior vulnerabilidade de desenvolvimento do SNC, com os aminoácidos L-arginina (FRAZÃO et al., 2008; MAIA et al., 2009) e L-glutamina (LIMA et al., 2009) facilitou a propagação da DAC, ao passo que o tratamento agudo na idade adulta com o aminoácido triptofano desacelerou a propagação do fenômeno (TRINDADE-FILHO et al. 2009).

3 HIPÓTESES

- O tratamento crônico com os aminoácidos taurina e alanina dificultam a propagação do fenômeno da DAC ao longo do tecido cortical;
- A condição de lactação desfavorável modula os efeitos destes aminoácidos sobre a DAC.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar, no rato, o efeito do tratamento crônico com taurina e alanina no início da vida, associada ou não a condições desfavoráveis de lactação, sobre o fenômeno dependente da atividade elétrica cerebral, denominado depressão alastrante cortical (DAC).

4.2 Objetivos específicos

Nas condições de tratamento acima descritas:

- Analisar a evolução do peso corporal dos filhotes, como indicador do desenvolvimento do organismo;
- Investigar as modificações de parâmetros da DAC (velocidade de propagação, bem como amplitude e duração de sua variação lenta de voltagem).

5 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS)/Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram previamente submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.021609/2013-67 – ANEXO B). As normas adotadas são sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e estão em consonância com aquelas estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Bethesda, USA).

5.1 Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, nascidos de matrizes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Durante a gestação e o aleitamento, as mães receberam dieta padrão do biotério (PRESENCE-Purina do Brasil Ltda; com 23% de proteína) e água *ad libitum*. Os animais durante todo o procedimento experimental foram alojados em gaiolas de polietileno (51 cm × 35,5 cm × 18,5 cm) e mantidos em sala com temperatura de 22 °C ± 1 °C, num ciclo de claro-escuro de doze horas (o período “claro” sempre iniciado às 06:00 h).

Neonatos de ambos os sexos, de mães distintas, foram reunidos e designados aleatoriamente para uma das duas condições distintas de lactação: 1) lactação normal (grupo L₉), ninhadas constituídas por 9 filhotes, e 2) lactação desfavorável (grupo L₁₅; ninhadas com 15 filhotes). É sabido que a condição de lactação desfavorável pelo aumento no tamanho da ninhada promove competição pelo leite materno levando a uma deficiência nutricional (ROCHA-DE-MELO et al, 2006). O desmame foi realizado, em ambos os grupos, no 25º dia de vida, considerando o dia do nascimento como 0 (zero; LIMA et al., 2009). Após o desmame os filhotes foram alimentados com a dieta padrão materna (“Presence”; Purina do Brasil Ltda.).

Todo o período experimental foi acompanhado de baixa mortalidade dos filhotes. Nos poucos casos existentes, contornamos com a adição de fêmeas de mesma data de nascimento para que a competição pelo leite materno persistisse até o último dia de aleitamento (25º dia de vida pós-natal).

5.2 Tratamento com taurina e alanina no início da vida (jovens)

Do 7° ao 27° dia de vida pós-natal, os neonatos L₉ e L₁₅ receberam por gavagem taurina e/ou L-alanina (Sigma, St. Louis, USA) conforme segue: apenas taurina (300 mg/kg/d; 11-L₉ e 11-L₁₅ filhotes); apenas alanina (300 mg/kg/d; 11-L₉ e 11-L₁₅ filhotes); taurina + alanina (300 mg/kg/d cada; 10-L₉ e 10-L₁₅ filhotes). A dose dos aminoácidos foi baseada na literatura (LIU et al., 2012). O tratamento foi administrado diretamente no estômago pela técnica de gavagem. Esta consiste na inserção de uma sonda orogástrica no animal, conectada a uma seringa de vidro (MAIA et al., 2009; LIMA et al., 2009; MENDES-DA-SILVA et al., 2014). Duas condições controle adicionais foram estudadas: (1) ingênuo (os animais não receberam qualquer gavagem; 11-L₉ e 10-L₁₅ filhotes); (2) veículo (receberam por gavagem o veículo - água destilada - em que os aminoácidos foram dissolvidos; 11-L₉ e 10-L₁₅ filhotes). O volume inicial administrado por sonda orogástrica foi de 0,5 mL/d na segunda e na terceira semanas de vida; e aumentou para 1,0 mL/d na quarta semana de vida, tal como descrito anteriormente (LIMA et al., 2009). Na Figura 8 está a representação esquemática dos grupos tratados no início da vida.

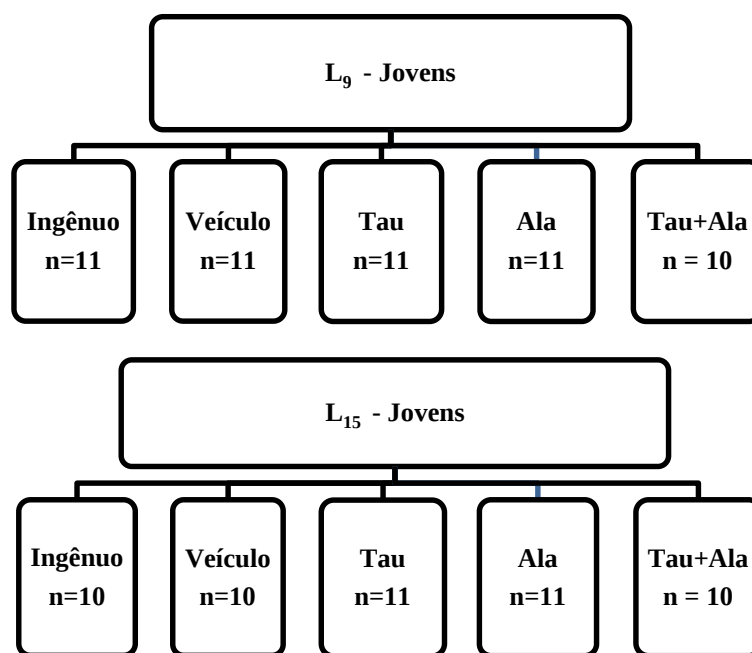


Figura 8. Representação esquemática dos grupos jovens do desenho experimental

5.3 Tratamento com taurina e alanina na idade adulta (adultos)

Do 90° ao 110° dia de vida pós-natal, um conjunto adicional de quatro grupos de ratos, na condição L₉, receberam 300 mg/kg/d taurina (n = 9) ou 300 mg/kg/d de alanina (n = 9), ou veículo (n = 8), ou nenhum tratamento (condição ingênuos; n = 9). Nós comparamos esses

grupos com os quatro grupos L₉ correspondentes tratados no início da vida. Nestes grupos de adultos, o volume administrado por sonda gástrica foi de 1,0 mL/100g de peso corporal/dia (LIU et al., 2012). Na Figura 9 está a representação esquemática dos grupos tratados na idade adulta.

Para ambos os grupos tratados jovens e adultos, os aminoácidos foram dissolvidos em água destilada imediatamente antes da administração. O procedimento da gavagem foi realizado sempre no mesmo horário, entre 12 e 14 horas.

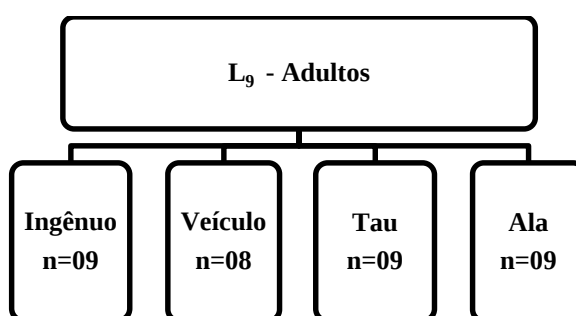


Figura 9. Representação esquemática dos grupos adultos do desenho experimental

5.4 Determinações de peso corporal

Os pesos corporais foram aferidos com auxílio de uma balança eletrônica da marca Filizola (capacidade de 3,0 kg e escala em divisão de 0,5 g). Nos grupos jovens aos 7, 14, 21, 28 dias de vida e no dia do registro eletrofisiológico (33-35 dias de vida); nos grupos adultos, apenas no dia do registro eletrofisiológico (116-120 dias de vida).

5.5 Registro da Depressão Alastrante Cortical

O registro eletrofisiológico da DAC foi realizado, sob anestesia com uma mistura de 1 g/Kg de uretana + 40 mg/Kg de alfa-cloralose (i.p.). Foram trepanados 3 orifícios no lado direito do crânio, para expor porções da superfície cortical. O orifício anterior (no osso frontal) foi utilizado para aplicar o estímulo que deflagrou a DAC; esta, ao se propagar, foi registrada nos outros dois orifícios (no osso parietal). Durante 4 horas, a variação lenta de voltagem da DAC foi registrada e gravada em um sistema digital (EMG systems) que permite a visualização e registro em computador. A DAC foi provocada a cada 20-30 minutos por estimulação química na região frontal, sendo utilizado para isto o cloreto de potássio (KCl) a 2%. Durante o registro, a temperatura retal do animal foi mantida em $37,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por meio de um aquecedor elétrico.

Foram calculados os seguintes parâmetros da DAC: 1) a velocidade média de propagação do fenômeno; 2) a amplitude e a duração da sua variação lenta de voltagem (MENDES-DASILVA et al., 2012). A velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela DAC para percorrer essa distância. Todas as informações sobre o animal foram anotadas em protocolo individual. Na figura 10 encontra-se esquema do registro eletrofisiológico da DAC.

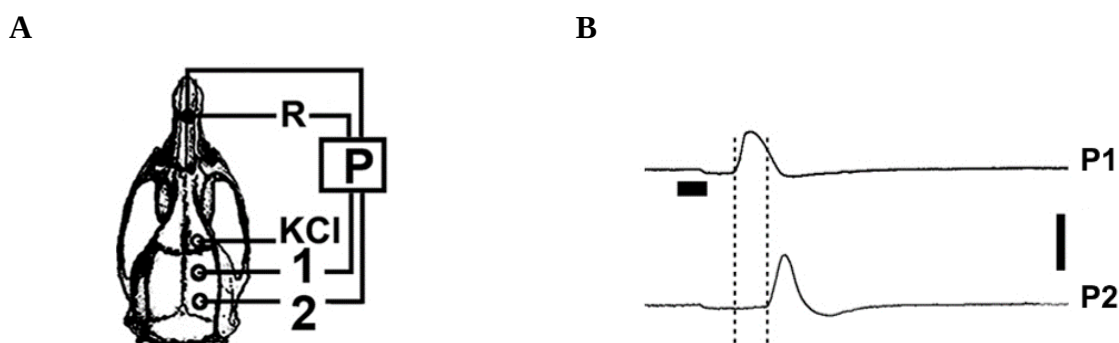


Figura 10. Esquema do registro eletrofisiológico da DAC. Em “A”, desenho do crânio de um rato com a identificação dos três orifícios necessários ao experimento. O orifício “KCl” corresponde ao local de estimulação (na região frontal); os pontos “1” e “2” correspondem aos dois pontos de registro da DAC propagada até a região parietal. Os eletrodos registradores colocados nos pontos 1 e 2 mediam as variações lentas de voltagem (VLV) da DAC, em relação a um eletrodo de referência comum (R), colocado nos ossos nasais. Em “B”, um traçado de registro em que a barra horizontal representa o tempo de 1 minuto (referente a presença do estímulo, KCl a 2%) e “P1” e “P2” correspondem ao registro da VLV nos pontos “1” e “2” respectivamente. A barra vertical corresponde a -10mV.

4.6 Eutanásia

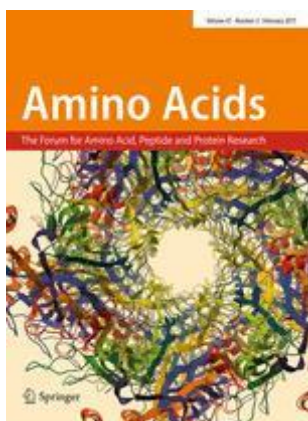
Ao final da sessão de registro, estando o animal ainda anestesiado, foi introduzida uma agulha na região bulbar, através da cisterna magna, provocando-se lesão dos centros de controle cardiorrespiratórios, com imediata parada da respiração, seguida por parada cardíaca.

4.7 Análise estatística

As diferenças inter-grupos foram analisadas utilizando-se a ANOVA, seguida, quando necessário, pelo teste *post hoc* “Holm Sidak”. Foram consideradas aceitas como significantes as diferenças em que $p < 0,05$.

RESULTADOS – ARTIGO ORIGINAL

Title: Neonatal taurine and alanine decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes



Authors: Elian da Silva **Francisco**, Rubem Carlos Araújo **Guedes**^{CA}

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

^{CA}-Corresponding author; Address: Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, BR-50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: rguedes@ufpe.br; guedes.rca@gmail.com

Telephone: +55-81-21268936; Fax: +55-81-21268473

(The email address of the corresponding author can be published)

Abstract

The amino acids taurine and alanine play a role in several physiological processes in the nervous system, including the electrical activity of the brain. In this study, we investigated the effect of chronic treatment with taurine or alanine or both on the excitability-dependent phenomenon known as cortical spreading depression (CSD), using young rats suckled under normal and unfavorable conditions (respectively litters with 9 and 15 pups; groups L₉ and L₁₅). From postnatal days 7 to 27, the animals received per gavage 300 mg/kg/d of taurine or alanine or both. At 33–35 days, under urethane+chloralose anesthesia, we recorded CSD and analyzed its parameters (velocity of propagation, amplitude, and duration). Compared with naïve- and water-treated controls, the groups chronically treated with taurine and/or alanine displayed reduced velocity of CSD ($p < 0.001$). This effect of both amino acids was also found in four additional L₉ groups (naïve, water, taurine, and alanine) treated at adulthood (90–110 days). The L₁₅ condition resulted in smaller durations and higher CSD velocities compared with the L₉ condition and appeared to potentiate the effects of the amino acids on CSD. These data are the first confirmation that chronic treatment with taurine and/or alanine decelerates CSD propagation regardless of lactation conditions (normal *versus* unfavorable lactation) or age at amino acid administration (young *versus* adult). The results suggest an inhibitory role for both amino acids on neuronal electrical activity, which deserves further investigation.

Keywords Taurine, Alanine, Brain development, Spreading depression, Brain excitability, Early undernutrition

Introduction

The amino acids taurine and alanine are abundant in mammals, and experimental evidence points to a role for both amino acids in several physiological processes in the nervous system (Wu et al. 2005; Rodríguez-Navarro et al. 2009; Wu and Prentice 2010; Schousboe et al. 2003). Taurine is involved in neuronal proliferation and differentiation (Chen et al. 1998), regulation of osmotic pressure and neuromodulation processes, and inhibitory neurotransmission (Wu et al. 2005; Rodríguez-Navarro et al. 2009; Wu and Prentice 2010). Supplementation with taurine is important because it operates as a scavenger of free radicals (Oliveira et al. 2010), is neuroprotective against glutamate-induced excitotoxicity (Pan et al. 2010) and ethanol-induced apoptosis (Taranukhin et al. 2010), and is cytoprotective (Wang et al. 2007).

Alanine is a simple amino acid that is involved in molecular biosynthesis in the central nervous system (CNS) (Westergaard et al. 1993). It can alleviate damage induced by oxidative stress (Estacion et al. 2003) and is also cytoprotective (Dadsetan et al. 2013). In mammals, including humans, alanine participates in the metabolic pathways of glycolysis, gluconeogenesis, and the tricarboxylic acid cycle (Schousboe et al. 2003). It serves as the precursor of several substances, including glutamate, glutamine (Waagepetersen et al. 2000), β -alanine (Tiedje et al. 2010), and γ -aminobutyric acid (GABA) (Schousboe et al. 2003). These substances share a close relationship in the CNS, participating in the fine and meticulous balance between excitatory and inhibitory mechanisms within the brain (Schousboe et al. 2003).

Cortical spreading depression (CSD) is a brain excitability-dependent, electrophysiological phenomenon, first described as a reduction in the spontaneous and evoked electrical activity of the cerebral cortex in response to a mechanical, electrical, or chemical stimulation of one point of the cortex (Leão 1944). It has been demonstrated in many animal species (Bureš et al. 1974), including humans (Dohmen et al. 2008; Fabricius et

al. 2008). CSD represents a transient neuronal depolarization accompanied by a negative shift in the DC (direct current) potential and a depression on electroencephalography. The phenomenon has been linked to brain excitability disorders and their diseases such as migraine with aura (Ferrari et al. 2015), multiple sclerosis (Petrusic et al. 2014), and epilepsy (Fabricius et al. 2008; Wei et al. 2014). Thus, CSD is an interesting and useful experimental model for evaluating the proper functioning of neural tissue (Guedes 2011; Petrusic et al. 2014).

Our group previously described in rats the CSD effects of administration of other amino acids early in life (Frazão et al. 2008; Lima et al. 2009; Maia et al. 2009), as well as in adulthood (Trindade-Filho et al. 2009). In addition, our group has investigated the CSD effects under conditions of nutritional alterations occurring early in life (Guedes 2011). Proper nutrition during early life stages is crucial for brain development in humans and other mammals because at this time point, developmental processes such as hyperplasia, hypertrophy, myelination, and organization of synapses occur rapidly. The brain is thus more vulnerable to environmental challenges, including unfavorable lactation conditions (Morgane et al. 1978; Rocha-de-Melo et al. 2006). In the rat, increasing the number of pups to be suckled by one dam is an easy way of creating unfavorable lactation conditions (Alamy and Bengelloun 2012). Litters with an increased number of pups enhance the demand for the dam's milk, which can result in a moderate state of malnutrition that can affect the electrical activity of the brain.

This study aimed to investigate the possible action of taurine and alanine on CSD. Considering that there is no information in the literature about the influence of neonatal taurine and alanine administration on the CSD features, we decided to characterize it in the cerebral cortex of young rats, suckled under normal and unfavorable conditions (respectively litters with 9 and 15 pups). Additionally, we compared amino acid effects in groups treated early in life (young groups) and in adulthood (adult groups). Our hypotheses were that

treatment with taurine and alanine would impair CSD propagation and that the unfavorable lactation condition would modulate the amino acid effects on CSD.

Material and methods

Animals

All experimental procedures were previously approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Research of our University (Approval protocol no. 23076.021609/2013-67), whose norms comply with those established by the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Bethesda, MD, USA).

Newborn male Wistar rats, born from distinct dams, were pooled and assigned to be suckled under normal or unfavorable conditions, represented respectively by litters with nine pups (L₉ groups; n = 89) and litters with fifteen pups (L₁₅ groups; n = 52).

After weaning (postnatal day 25), the pups had free access to water and the same commercial lab chow, with 23% protein, that was offered to their dams (Purina Ltd). They were housed in polyethylene cages (51 cm × 35.5 cm × 18.5 cm) under controlled temperature at 22 ± 1°C with a 12-h light:12-h dark cycle (lights on at 6:00 AM).

Taurine and alanine treatment early in life (young groups)

From postnatal days 7 to 27, L₉ and L₁₅ pups received per gavage taurine and/or L-alanine (purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA), as follows: only taurine (300 mg/kg/d; 11 L₉ and 11 L₁₅ pups); only alanine (300 mg/kg/d; 11 L₉ and 11 L₁₅ pups); and taurine plus alanine (300 mg/kg/d each; 10 L₉ and 10 L₁₅ pups). Amino acid doses were based on the literature (Liu et al. 2012). Two additional control groups received no gavage (naïve group; 11 L₉ and 10 L₁₅ pups) or vehicle (distilled water; 11 L₉ and 10 L₁₅ pups). The initial volume administered per gavage was 0.5 mL/d in the second and third weeks of life; it was increased to 1.0 mL/d in the fourth week of life, as previously described (Lima et al. 2009). We measured body weight at

postnatal days 7, 14, 21, 28, and 33–35 (when we performed the electrophysiological recordings).

Taurine and alanine treatment at adulthood (adult groups)

From postnatal days 90 to 110, an additional set of four groups of L₉ rats received 300 mg/kg/d taurine (n = 9), 300 mg/kg/d L-alanine (n = 9), vehicle (n = 8), or no treatment (naïve condition; n = 9). We compared these groups with the four corresponding L₉ groups treated early in life. In these adult groups, the volume administered per gavage was 1.0 mL/100 g body weight/day (Liu et al. 2012). We measured body weight on the day of the electrophysiological recording (116–120 days of life).

For treated young and adult groups, amino acids were dissolved in distilled water immediately before administration. The gavage occurred between 12 AM and 2 PM.

CSD recording

On the day of the electrophysiological recording, each animal was anesthetized with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose injected intraperitoneally. Three trephine holes were drilled on the right side of the skull, aligned in the frontal-to-occipital direction and parallel to the midline. One hole was positioned on the frontal bone (2 mm in diameter) and used to apply the stimulus (KCl) to elicit CSD. The other two holes were positioned on the parietal bone (3–4 mm in diameter) and used to record the propagating CSD wave. CSD was elicited at 20-min intervals by a 1-min application of a cotton ball (1–2 mm in diameter) soaked with 2% KCl solution (approximately 270 mM) to the anterior hole drilled at the frontal region. Rectal temperature was continuously monitored and maintained at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by means of a heating blanket. The DC slow potential change accompanying CSD was recorded for 4 h using two Ag–AgCl agar–Ringer electrodes (one in each hole) against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bones. We calculated the CSD

velocity of propagation from the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical electrodes. In the two cortical recording places, we used the initial point of each DC-negative rising phase as the reference point to calculate the CSD velocities. In addition, we calculated amplitude and duration of the CSD waves, as previously reported (Mendes-da-Silva et al. 2014).

Statistics

Results in all groups are expressed as means $\pm$ standard deviations. Body weights and CSD propagation rates were compared between groups using ANOVA, including as factors lactation conditions (L₉ and L₁₅), gavage treatment (naïve, water, taurine, alanine, both), and ages (young and adult L₉ condition) followed by a *post hoc* test (Holm–Sidak), where indicated. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Body weight

In the five young groups, ANOVA showed a main effect of the lactation condition for body weight during the whole suckling period ($p < 0.001$). The L₁₅ animals presented with lower ($p < 0.001$) body weights compared with the L₉ groups. The weight reduction ranged from 20.1% to 36.5% and was independent of the gavage treatment. In the animals treated in adulthood, the mean body weights (in g) were 381.5 ± 45.6 for the naïve group ($n = 9$), 367.8 ± 24.3 for the water group ($n = 8$), 391.0 ± 20.8 for the taurine group ($n = 9$), and 383.7 ± 20.3 for the alanine group ($n = 9$). No intergroup difference was observed. Data on body weights are illustrated in Figure 1.

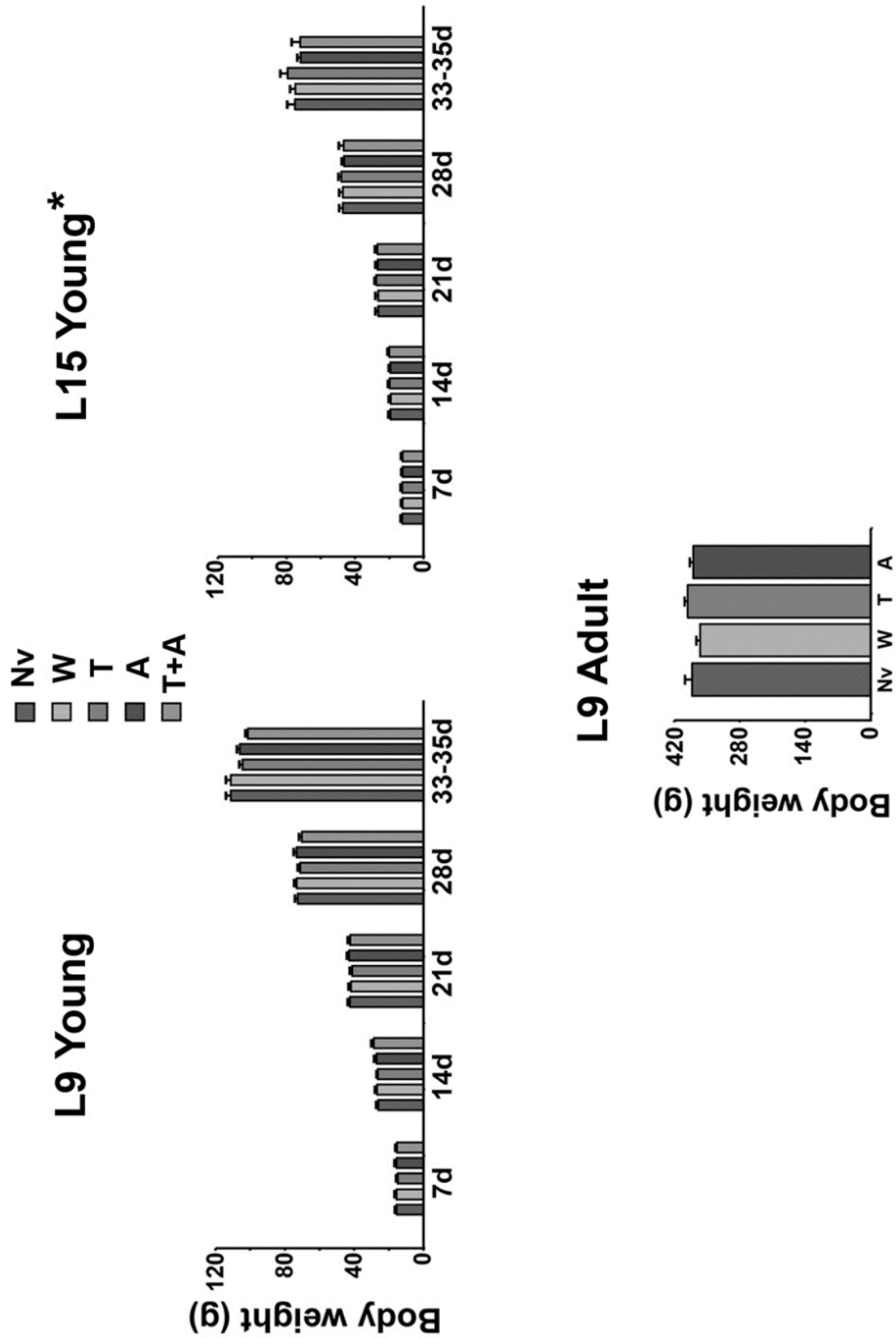


Fig. 1 Body weight of young (upper panels) and adult rats (lower panel). Rats were previously suckled in litters of 9 and 15 pups (respectively L₉ and L₁₅ condition). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. for 48 L₉ and 45 L₁₅ young rats and 35 L₉ adult rats. Asterisks indicate L₁₅ weights that are significantly lower than the corresponding L₉ values ($p < 0.001$; one-way ANOVA followed by the Holm–Sidak test)

CSD velocity of propagation

In all groups, stimulation with 2% KCl (approximately 270 mM) at one point of the frontal cortical surface for 1 min elicited, as a rule, a single CSD wave that propagated without interruption and was recorded at the two parietal recording points (Figure 2; see the recording points in the skull diagrams). During the 4-h recording, the appearance of the slow potential change confirmed the presence of CSD after KCl stimulation.

Young

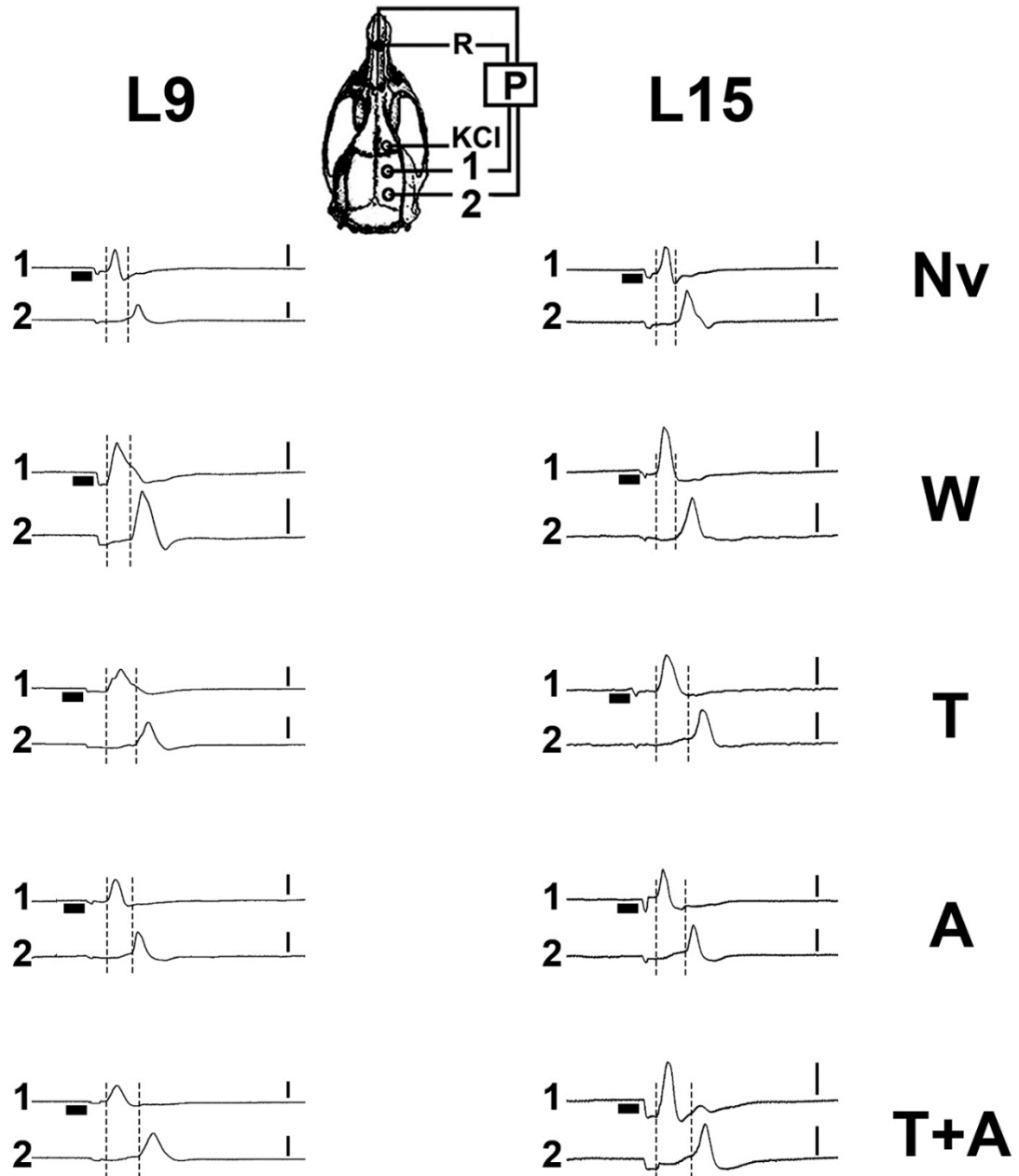


Fig. 2 Recordings of the slow potential changes (P) during cortical spreading depression (CSD) at two cortical points (1 and 2) in 10 young rats (5 L₉ rats and 5 L₁₅ rats). The diagram of the skull shows recording positions 1 and 2 from which the traces marked at the left with the same numbers were obtained. The position of the common reference electrode (R) on the nasal bones and the application point of the CSD-eliciting stimulus (KCl) are also shown. Nv, naïve group; W, T, A, and T+A are rats treated per gavage with water, taurine, alanine, and taurine+alanine, respectively. The vertical bars indicate 10 mV for P (negative upwards). CSD was elicited in the frontal cortex by chemical stimulation (a 1–2 mm diameter cotton ball soaked with 2% KCl) applied for 1 min on the intact dura mater, as indicated by the horizontal bars. The vertical dashed lines indicate the latency for a CSD wave to cross the inter-electrode distance. The latencies were shorter in the L₁₅ groups compared with the corresponding L₉ groups. The latencies were larger in the groups treated with T, A, and T+A under both lactation conditions when compared with the respective Nv and W controls

In the young rats, ANOVA indicated intergroup differences, and *post hoc* (Holm–Sidak) test comparisons showed that the velocities were higher ($p < 0.001$) in the L₁₅ groups compared to the L₉ groups. Concerning gavage treatment, ANOVA detected a main effect, and *post hoc* testing revealed that treatment with taurine, alanine, or both significantly lowered the CSD propagation velocities ($p < 0.001$) compared with the naïve and water controls. In the early treated groups, the amino acid decelerating effect on CSD propagation was more intense in L₁₅ than L₉ rats ($p < 0.001$), indicating an interaction between the treatment with taurine and/or alanine and the lactation condition. In the L₉ young animals, the CSD velocity (mean $\pm$ SD in mm/min) in the naïve and water controls was respectively 3.86 ± 0.14 and 3.86 ± 0.07 . In groups treated with taurine, alanine, or both, the CSD velocity was significantly lower (respectively 3.34 ± 0.15 , 3.36 ± 0.12 , and 3.36 ± 0.09 ; $p < 0.001$). In L₁₅ young animals, the CSD velocities in the control groups were higher than in the L₉ condition (4.68 ± 0.21 and 4.54 ± 0.13 for the naïve and water groups, respectively). Treatment with taurine, alanine, or both resulted in lower CSD velocity compared with L₁₅ controls (3.56 ± 0.25 for the taurine group, 3.56 ± 0.10 for the alanine group, and 3.53 ± 0.17 for the group treated with both; $p < 0.001$). Data on CSD velocity in young animals are in the upper panel of Figure 3.

The lower panel of Figure 3 shows the CSD velocity of the groups treated in adulthood. Experiments confirmed the CSD effects of taurine and alanine observed in the young groups. In the adult rats, the velocity was 3.31 ± 0.07 for the naïve condition, 3.32 ± 0.07 for the water group, 2.95 ± 0.11 for the taurine-treated animals, and 2.94 ± 0.15 for the alanine group.

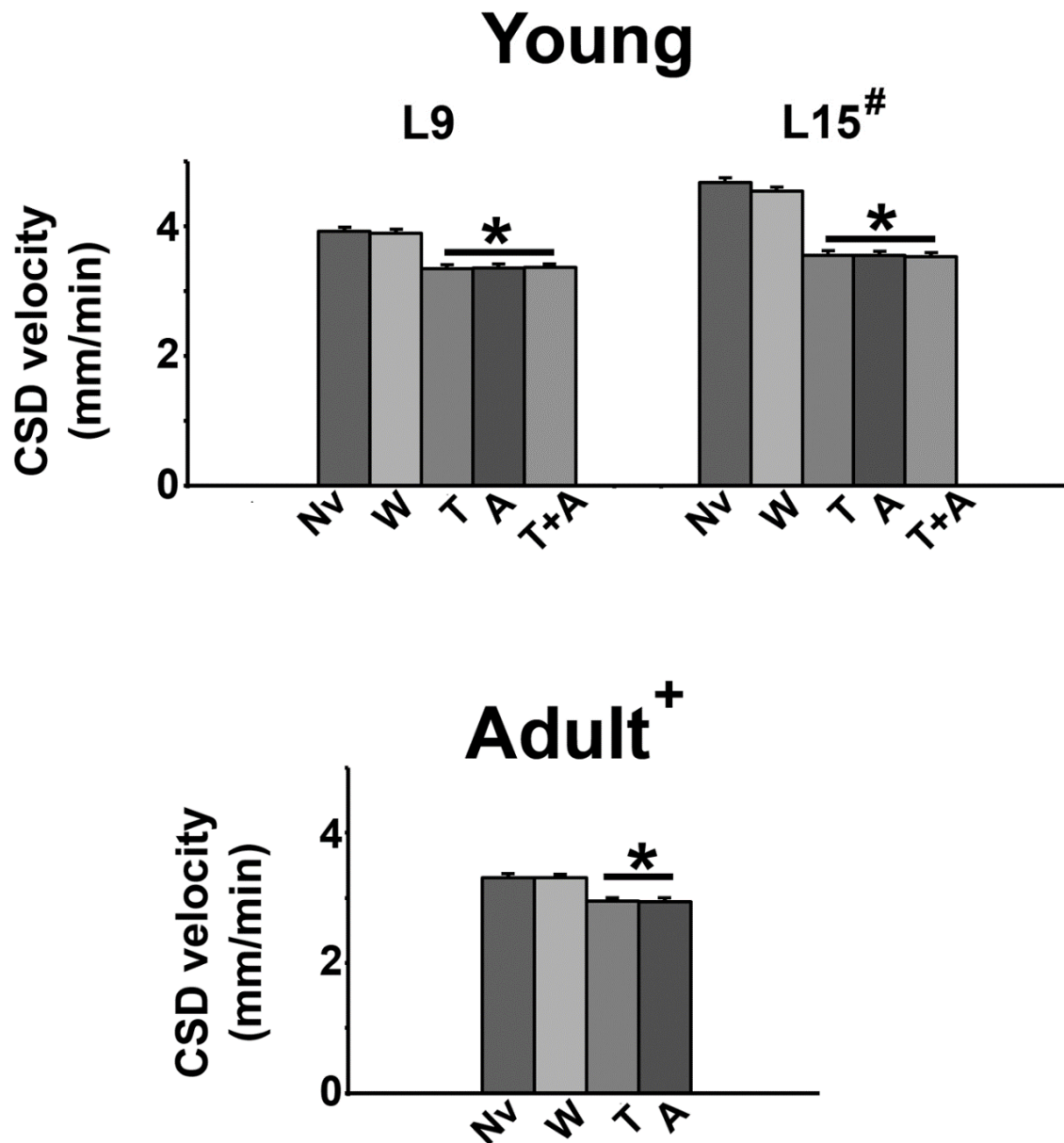


Fig. 3 CSD velocity of young rats (33–35 days old; upper panel) and adult rats (116–120 days old; lower panel). At the young age, rats were suckled in two distinct lactation conditions represented by litters with 9 and 15 pups (respectively L₉ and L₁₅ groups). The adult rats were studied only in the L₉ condition. Nv, naïve group; W, T, A, and T+A are rats treated per gavage with water, taurine, alanine, and taurine+alanine, respectively. Data are mean $\pm$ S.E.M. Asterisks indicate values that are significantly different from the Nv- and W-control groups ($p < 0.001$; ANOVA followed by the Holm–Sidak test). # indicates all L₁₅ groups that were significantly different from the corresponding L₉ groups ($p < 0.01$). + denotes age difference (adult < young; $p < 0.01$)

Amplitude and duration of CSD waves

Tables 1 and 2 respectively show data on amplitude and duration of the negative slow potential change, the hallmark of CSD. The mean amplitude varied from 9.41 ± 1.94 mV to 12.66 ± 4.53 mV in the L₉ groups and from 10.70 ± 3.12 mV to 14.03 ± 2.87 mV in the L₁₅

groups (Table 1), and no intergroup differences were observed. The mean duration varied from 68.10 ± 2.23 s to 71.30 ± 2.61 s in the L₉ groups and from 67.27 ± 1.06 s to 69.12 ± 1.53 s in the L₁₅ groups (Table 2). ANOVA revealed shorter durations in L₁₅ compared with L₉ rats.

Table 1 Amplitude of the slow potential change of cortical spreading depression in young (33–35 days of life) and adult rats (116–120 days). Nv, naïve (no treatment); W, distilled water; T, 300 mg/kg/d taurine; A, 300 mg/kg/d alanine; T + A, 300 mg/kg/d taurine + 300 mg/kg/d alanine. Treatments were per gavage. L₉ and L₁₅ were previously suckled under normal or unfavorable lactation conditions (respectively in litters with 9 and 15 pups). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, with the number of animals in parentheses. No intergroup significant differences were observed.

TREATMENT GROUPS	Amplitude (mV)		
	L ₉ - Young	L ₁₅ - Young	L ₉ - Adult
Nv	11.07 ± 2.56 (11)	13.20 ± 3.26 (7)	10.47 ± 3.15 (7)
W	11.11 ± 4.49 (11)	14.03 ± 2.87 (8)	9.41 ± 1.94 (7)
T	12.12 ± 3.71 (11)	12.28 ± 3.62 (7)	10.66 ± 3.73 (8)
A	12.45 ± 4.42 (11)	12.79 ± 3.57 (8)	9.64 ± 2.30 (8)
T + A	12.66 ± 4.53 (10)	10.70 ± 3.12 (10)	---

Table 2 Duration of the negative slow potential change of the cortical spreading depression in young (33–35 days of life) and adult rats (116–120 days). Nv, naïve (no treatment); W, distilled water; T, 300 mg/kg/d taurine; A, 300 mg/kg/d alanine; T + A, 300 mg/kg/d taurine + 300 mg/kg/d alanine. Treatments were per gavage. L₉ and L₁₅ groups were previously suckled under normal or unfavorable lactation conditions (respectively in litters with 9 and 15 pups). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, with the number of animals in parentheses. Asterisks indicate L₁₅ values that are significantly lower than corresponding L₉ values ($p < 0.007$).

TREATMENT GROUPS	Duration (s)		
	L ₉ - Young	L ₁₅ - Young	L ₉ - Adult
Nv	69.73 $\pm$ 4.68 (9)	66.92 $\pm$ 2.45* (8)	68.10 $\pm$ 2.23 (8)
W	71.01 $\pm$ 4.63 (8)	69.01 $\pm$ 1.63* (7)	69.76 $\pm$ 4.03 (7)
T	69.43 $\pm$ 5.63 (10)	68.38 $\pm$ 2.46* (9)	69.56 $\pm$ 3.59 (7)
A	71,30 $\pm$ 2.61 (8)	69.12 $\pm$ 1.53* (7)	69.62 $\pm$ 6.64 (8)
T + A	70.07 $\pm$ 2.73 (7)	67.27 $\pm$ 1.06* (7)	---

Discussion

Our data clearly demonstrate that chronic treatment with taurine and/or alanine reduces the propagation velocity of CSD regardless of lactation conditions (normal *versus* unfavorable lactation) or age at amino acid treatment (young *versus* adult). The stress of the gavage procedure cannot be the cause of the CSD deceleration because the groups that received distilled water by gavage showed a CSD propagation velocity similar to the naïve groups that received no gavage. These results reinforce the importance of these amino acids for the proper

electrophysiological functioning of the brain and suggest that chronic treatment with taurine and/or alanine can modulate, at least in part, the brain's ability to propagate CSD.

Interestingly, no additive effect was observed in the group treated simultaneously with both amino acids, suggesting that this type of cooperation is not important for the action of both amino acids on the CSD; indeed, a lack of additive effects has been already reported for action potentials in cerebellar slices (Okamoto and Quastel 1976).

Although in this study we did not monitor the blood and brain levels of amino acids, based on evidence in the literature, we consider it reasonable to assume that chronic treatment with taurine and/or alanine might have caused an imbalance in some cerebral areas in the concentrations of these and other amino acids. Specifically, the chronic (Murakami and Furuse 2010) and acute administration of taurine (Molchanova et al. 2007) results in an increased concentration of taurine and other amino acids in distinct regions of the rat brain. Notably in humans, continuous L-alanine/L-glutamine infusion (0.75 g/kg/d up to 5 days) significantly increases levels of both glutamine and alanine in the plasma and brain of patients with severe traumatic brain injury (Nägeli et al. 2014).

Taurine affects the distribution of other amino acids in the brain, acts on GABA receptors, and modulates synaptic transmission (Wu and Prentice 2010). All of these actions can affect CSD features (e.g., Miura et al. 2013). However, based on our findings and with support from the literature, we can speculate about two types of mechanisms that deserve particular attention: direct mechanisms based on primary actions of the amino acids, and indirect mechanisms by which taurine and alanine act via a secondary metabolic pathway.

Concerning the direct mechanisms, one possibility is that the amino acids counteract oxidative stress in the brain. It is important to note that taurine and alanine can protect the CNS from damage caused by oxidative stress in a variety of conditions (Li et al. 2012; Rosemberg et al. 2010; Sinha et al. 2008; Grosser et al. 2004). These findings collectively

lead us to consider a possible role for taurine and alanine in the effective elimination of free radicals, aiding in promoting an oxidative balance in the organism.

It is interesting to note also that increasing reactive oxygen species levels in the CNS can elicit CSD both *in vitro* (Netto and Martins-Ferreira 1989) and *in vivo* (El-Bachá et al. 1998). Our group has studied the CSD effects of other antioxidant molecules such as astaxanthin (Abadie-Guedes et al. 2008) and ascorbic acid (Mendes-da-Silva et al. 2014). Thus, we suggest that taurine and alanine might have contributed to a reduction in the speed of propagation of CSD because of their possible role as antioxidant molecules in the CNS. However, further investigation is needed to clarify the role of taurine and alanine as possible antioxidant molecules in biological systems, including their action via indirect mechanisms.

Concerning indirect mechanisms, both *in vitro* and *in vivo* evidence demonstrates the action of taurine as a regulator of neuronal excitability and activity by interacting with glycinergic and GABAergic receptors (Okamoto et al. 1983; Wu and Prentice 2010; Song et al. 2012). Alanine appears to act differentially on glutamatergic and GABAergic neurons (Schousboe et al. 2003). Although the enzymatic activity of alanine aminotransferase is relatively modest in glutamatergic neurons (Westergaard et al. 1993), GABAergic neurons express the entire enzymatic machinery necessary to perform the metabolic reaction constituting the GABA shunt. In an operating GABA shunt, alanine and glutamate can be used as metabolic fuel for GABA synthesis; alanine donates the amino group to α -ketoglutarate, yielding L-glutamic acid, which undergoes decarboxylation by glutamic acid decarboxylase, resulting in GABA (Schousboe et al. 2003). Therefore, we suggest that chronic treatment with alanine reduces excitability by increasing synthesis of GABA.

Nutritional inadequacy remains a major non-genetic factor that affects the developing brain (Alamy and Bengelloun 2012). Nutrient intake in insufficient quantity and/or quality can disrupt the biochemical and morphological organization of the brain (Morgane et al. 2002) and accelerate CSD propagation (Guedes 2011; Mendes-da-Silva et al. 2014). Our L₁₅

CSD data confirm the facilitating action of early malnutrition. Concerning the mechanisms by which malnutrition facilitates CSD propagation, we know that a larger extracellular space volume in the brain hinders CSD elicitation and propagation (Mazel et al. 2002). Inadequate nutrient intake early in life increases cell-packing density and reduces the extracellular space, leading to facilitation of CSD. Another important factor that modulates CSD propagation is cortical myelination. Previous work has demonstrated an inverse correlation between the degree of cortical myelination and CSD propagation velocity (Merkler et al. 2009). Nutritional deficiency reduces brain myelination and increases CSD propagation velocity (De Luca et al. 1977; Rocha-de-Melo et al. 2006). Furthermore, malnutrition impairs glial function (Morgane et al. 1978), and this glial impairment facilitates CSD (Largo et al. 1997). In addition, malnourished rats present increased levels of the enzyme glutamic acid decarboxylase (Díaz-Cintra et al. 2007). This condition, in association with reduced brain glutamate uptake (Feoli et al. 2006), enhances extracellular glutamate in the malnourished brain, which might contribute to CSD facilitation.

Our findings also suggest that unfavorable lactation itself (L₁₅ condition) can modulate the action of taurine and alanine on CSD, impairing its velocity of propagation more intensely than in the L₉ condition. This kind of malnutrition-associated CSD modulation has been previously demonstrated for the convulsant drug pilocarpine (Vasconcelos et al. 2004). We found that the L₁₅ condition enhanced the effects of taurine and alanine on CSD. Taken together, these data suggest different responsiveness of the CSD to distinct classes of compounds. If this inference could be confirmed in the human brain concerning the neural action of therapeutic drugs, then the effectiveness of such drugs might possibly oscillate as a function of the early nutritional status of the patient, an idea that warrants further investigation.

The CSD propagation velocity decreases with age (Guedes et al. 1996), indicating that the aging process is related to the enhancement of the brain resistance to CSD (Batista-de-

Oliveira et al. 2012), which the present study confirms. In comparison to young animals, our adult rats presented lower velocities of propagation of CSD. Although several mechanisms could explain these findings, we consider that oxidative stress and age-related impairment of cerebral blood flow are more likely involved, as previously discussed (Batista-de-Oliveira et al. 2012).

In conclusion, this study describes a novel effect of the amino acids taurine and alanine on the excitability-related CSD phenomenon in rats. The *in vivo* data support four conclusions. First, amino acid administration at either young or adult ages decelerates CSD. Second, the effects of taurine and alanine are not additive. Third, increasing litter size accelerates CSD and increasing age decelerates it, confirming previous studies. Fourth, in young rats, an unfavorable lactation condition intensifies the amino acid effects on CSD. The present data might advance understanding of the relationship among amino acids, CSD, neuronal excitability, and nutrition in the brain.

Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE-IBPG-0141-2.07/12), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finepno.4191), and Capes (Edital 043/2013 Ciências Do Mar II). RCA Guedes is a Research Fellow from CNPq (no. 301190/2010-0).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abadie-Guedes, R, Santos, SD, Cahú, TB, Guedes, RCA, Bezerra, RS (2008) Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. *Alcohol Clin. Exp Res* 32: 1417–1421
- Alamy M, Bengelloun WA (2012) Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neurosci Biobehav R* 36: 1463-1480
- Batista-de-Oliveira M, Lopes AAC, Mendes-da-Silva RF, Guedes RCA (2012) Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. *Exp Gerontol* 47: 452-457
- Bureš J, Buresová O, Krivánek J (1974) The mechanism and applications of Leão's spreading depression of electroencephalographic activity. Academia, Prague
- Chen XC, Pan ZL, Liu DS, Han X (1998) Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 442: 397-403
- Dadsetan S, Kukolj E, Bak LK, Serensen M, Ott P, Vilstrup H, Schousboe A, Keiding S, Waagepetersen HS (2013) Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures. *J Cerebr Blood F Met* 33: 1235-1241
- De Luca B, Cioffi LA, Bureš J (1977) Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Act Nerv Super* 19: 130-131
- Díaz-Cintra S, González-Maciel A, Morales MA, Aguilar A, Cintra L, Prado-Alcalá RA (2007) Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1–3 subfields of the dorsal hippocampus. *Exp Neurol* 208: 47-53

- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R (2008) Co-operative study of brain injury depolarisations (COSBID) spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 63:720-728
- El-Bachá RS, Lima-Filho JL, Guedes RCA (1998) Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. *Nutr Neurosci* 1: 205–212
- Estacion M, Weinberg JS, Sinkins WG, Shilling WP (2003) Blockade of maitotoxin-induced endothelial cell lysis by glycine and L-alanine. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: 1006-1020
- Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, Boutelle MG, Hartings JA, Bullock R, Strong AJ, Lauritzen M (2008) Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin Neurophysiol* 119: 1973–1984.
- Feoli AM, Siqueira IR, Almeida L, Tramontina AC, Vanzella C, Sbaraini S, Schweigert ID, Netto CA, Perry ML, Gonçalves CA (2006) Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 22: 160-165
- Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AMJM (2015) Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol* 14: 65-80
- Frazão MF, Maia LMSS, Guedes RCA (2008) Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. *Neurosci Lett* 4: 26-30
- Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A, Schröder H (2004) Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 ferritin as possible mediators. *Biochem Bioph Res Co* 314: 351-355

- Guedes RCA, Amorim LF, Teodósio NR (1996) Effect of aging on cortical spreading depression. *Braz J Med Biol Res* 29: 1407-1412
- Guedes RCA (2011) 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.
- Largo C, Ibarz JM, Herreras O (1997) Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J Neurophysiol* 78: 295-307
- Leão AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7: 359–390
- Li Y, Hu Z, Chen B, Bu Q, Lu W, Deng Y, Zhu R, Shao X, Hou J, Zhao J, Li H, Zhang B, Huang Y, Lv L, Zhao Y, Cen X (2012) Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. *Toxicol Lett* 215: 1-7
- Lima DSC; Maia LMSS; Barboza EA; Duarte RA; Sousa LS; Guedes RCA (2009) L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. *Life Sci* 85: 241-247
- Liu J, Liu L, Wang X, Teng H, Yang N (2012) Antenatal supplementation of taurine for protection of fetal rat brain with intrauterine growth restriction from injury by reducing neuronal apoptosis. *Neuropediatrics* 43: 258-263
- Maia LMSS, Amâncio-dos-Santos A, Duda-de-Oliveira D, Angelim MKC, Germano PCP, Santos SF, Guedes RCA (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
- Mazel T, Richter F, Vargová L, Syková E (2002) Changes in extracellular space volume and geometry induced by cortical spreading depression in immature and adult rats. *Physiol Res* 51 (Suppl 1): 85–93

- Mendes-da-Silva RF, Lopes-de-Morais AAC, Bandin-da-Silva ME, Cavalcanti GA; Rodrigues ARO, Andrade-da-Costa BLS, Guedes RCA (2014) Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. *Neuropharmacology* 86: 155-160
- Merkler D, Klinker F, Jürgens T, Glaser R, Paulus W, Brinkmann BG, Sereda MW, Stadelmann-Nessler C, Guedes RCA, Brück W, Liebetanz D (2009) Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann Neurol* 66: 355-365
- Miura R, Huang H, Wylie JJ (2013) Mathematical approaches to modeling of cortical spreading depression. *Chaos* 23:046103. doi: 10.1063/1.4821955
- Molchanova SM, OJA SS, Saransaari P (2007) Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus. *Proc West Pharmacol Soc* 50: 95-97
- Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O (1978) The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav R* 2: 137–230
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav R* 26: 471-483
- Murakami T, Furuse M (2010) The impact of taurine - and beta-alanine-supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. *Amino Acids* 39: 427-434
- Nägeli M, Fasshauer M, Sommerfeld J, Fendel A, Brandi G, Stover JF (2014) Prolonged continuous intravenous infusion of the dipeptide L-alanine- L-glutamine significantly increases plasma glutamine and alanine without elevating brain glutamate in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care* 18: 1-12

- Netto M, Martins-Ferreira H (1989) Elicitation of spreading depression by rose Bengal photodynamic action. *Photochem Photobiol* 50: 229-234
- Okamoto K, Quastel JH (1976) Effects of amino acids and convulsants on spontaneous action potentials in cerebellar cortex slices. *Br J Pharmac* 57: 3-15
- Okamoto K, Kimura H, Sakai Y (1983) Evidence for taurine as an inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: selective antagonism by TAG (6am inomethyl-3-methyl-4 H,1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide). *Brain Res* 265: 163-168
- Oliveira MWS, Minotto JB, Oliveira MR, Zanotto-Filho A, Behr GA, Rocha RF, Moreira JCF, Klamt F (2010) Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacol Rep* 62: 185-193
- Pan C, Gupta A, Prentice H, Wu JY (2010) Protection of taurine and granulocyte colony-stimulating factor against excitotoxicity induced by glutamate in primary cortical neurons. *J Biomed Sci* 17 [Suppl 1]
- Petrusic I, Zidverc-Trajkovic J (2014) Cortical spreading depression: origins and paths as inferred from the sequence of events during migraine aura. *Funct Neurol* 29: 207-212
- Rocha-de-Melo AP, Cavalcanti JB, Barros AS, Guedes RCA (2006) Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr Neurosci* 9: 155–160
- Rodríguez-Navarro JA, Gonzalo-Gobernado R, Herranz AS, Gonzalez-Vigueras JM, Solís JM (2009) High potassium induces taurine release by osmosensitive and osmoresistant mechanisms in the rat hippocampus in vivo. *J Neurosci* 29: 208-217
- Rosemberg DB, Da Rocha RF, Rico EP, Zanotto-Filho A, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Moreira JCF, Klamt F, Souza DO (2010) Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 17: 683-692

- Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS (2003) Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons. *Neurochem Int* 43: 311-315
- Sinha M, Manna P, Sil PC (2008) Cadmium-induced neurological disorders: prophylactic role of taurine. *J Appl Toxicol* 28: 974-986
- Song NY, Shi HB, Li CY, Yin SK (2012) Interaction between taurine and GABA_A/glycine receptors in neurons of the rat anteroventral cochlear nucleus. *Brain Res* 1472: 1-10
- Taranukhin AG, Taranukhina EY, Saransaari P, Podkletnova IM, Pelto-Huikko M, Oja SS (2010) Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. *J Biomed Sci* 17 (Suppl 1):S12. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S12
- Trindade-Filho EM, Vasconcelos CA, Guedes RCA (2009) Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in RE sleep deprived and non-deprived adult rats. *Psychol Neurosci* 2: 235-241
- Tiedje KE, Stevens K, Barnes S, Weaver DF (2010) B-Alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Int* 57: 177-188
- Vasconcelos CAC, Oliveira JAF, Costa LAO, Guedes RCA (2004) Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. *Nutr Neurosci* 7: 163-170
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A (2000) A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem* 75: 471–479
- Wang GH, Jiang ZL, Fan XJ, Zhang L, Li X, Ke KF (2007) Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABA_A and glycine receptors. *Neuropharmacology* 52: 1199-1209
- Wei Y, Ullah G, Schiff SJ (2014) Unification of neuronal spikes, seizures, and spreading depression. *J Neurosci* 35: 11733-11743

- Westergaard N, Varming T, Peng L, Sonnewald U, Hertz L, Schousboe A (1993) Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res* 35: 540– 545
- Wu H, Jin Y, Wei J, Jin H, Sha D, Wu JY (2005) Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res* 1038: 123-131
- Wu JY, Prentice H (2010) Role of taurine in the central nervous system. *J Biomed Sci* 17(Suppl 1):S1.doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S1

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados *in vivo* da presente dissertação nos permitem as seguintes conclusões:

- O tratamento crônico com taurina e alanina torna o tecido cortical mais resistente à propagação do fenômeno da DAC e esse efeito independe da idade do tratamento.
- O tratamento simultâneo com ambos os aminoácidos não resulta em efeito aditivo.
- Em ratos jovens, a condição desfavorável de lactação, induzida pelo aumento da quantidade de filhotes por ninhada, intensifica os efeitos dos aminoácidos sobre a DAC.
- A condição desfavorável de lactação acelera e a idade desacelera a propagação da DAC, confirmando trabalhos prévios.
- Os pesos corporais reduzidos, observados na condição de lactação desfavorável corroboram outros estudos, confirmando a eficácia do modelo experimental utilizado para induzir deficiência nutricional.

7.1 Perspectivas

Almejando dar continuidade a este trabalho, sugere-se como perspectivas, caracterizar:

- Os efeitos da administração aguda (ou por curto prazo) dos aminoácidos taurina e alanina, sobre a DAC.
- Os efeitos da administração desses aminoácidos por vias diferentes (intraperitoneal e tópica) sobre a DAC.
- O possível efeito duradouro da administração desses aminoácidos.
- Os efeitos da taurina e da alanina em neonatos amamentado sob condições favoráveis de lactação (ninhadas com número de filhotes reduzido).

- Os efeitos desses aminoácidos em diferentes modelos de desnutrição.
- A relação entre doses diferentes de taurina e alanina, e seus efeitos sobre a DAC (“curva dose-resposta”)
- Níveis cerebrais de taurina, alanina, glutamato, GABA em animais tratados com taurina e alanina, objetivando correlacioná-los com os efeitos eletrofisiológicos descritos.
- A administração desses aminoácidos associada a modelos experimentais que mimetizam desordens neurológicas, como o modelo da pilocarpina.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES R.; SANTOS S.D.; CAHÚ T.B.; GUEDES R.C.A.; BEZERRA R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32 (8), p. 1417-1421, 2008.
- ACIOLY, N.E., BENEVIDES, R.D.L., COSTA, B.L.S.A., GUEDES, R.C.A. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, p. 405-410, 2012.
- AGOSTONI, C.; CARRATÙ, B.; BONIGLIA, C.; LAMMARDO, A.M.; RIVA, E.; SANZINI, E. Free glutamate and glutamic acid increase in human milk through a three-month lactation period. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 31(5), p. 508-512, 2000.
- ALAMY, M.; BENGELLOUN, W.A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1463-1480, 2012.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.S.S.; GERMANO, P.C.P.S.; NEGRÃO, Y.D.S.; GUEDES, R.C.A. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 70-75, 2013.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; PINHEIROS, P.C.F.; LIMA, D.S.C.; OZIAS, M.G.; BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; GUIMARÃES, N.X.; GUEDES, R.C.A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, p. 275-282, 2006.
- AMARAL, A.P.B., BARBOSA, M.S.S., SOUZA, V.C., RAMOS, I.L.T., GUEDES, R.C.A. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. **Experimental Neurology**, v. 219, p. 492-498, 2009.
- BENTON, D. The influence of children's diet on their cognition and behavior. **European Journal of Nutrition**, v. 47 (3), p. 25-37, 2008.
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A.A.C.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; GUEDES, R.C.A. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Experimental Gerontology**, v. 47, p. 452-457, 2012.
- BATISTA-FILHO, M.; RISSIN, A. Transição Nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 19 (1), p. 181-191, 2003.
- BIRDSALL, T.C. Therapeutic applications of taurine. **Alternative Medicine Review**, v. 3, p. 128-136, 1998.

BORBA, J.M.C.; ARAÚJO, M.S.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; GUEDES, R.C.A. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 193–201, 2000.

BUREŠ, J.; BURESOVÁ, O.; KRIVÁNEK, J. The mechanism and applications of Leão's spreading depression of electroencephalographic activity. **Academia, Prague**, 1974.

CHEN, X.C.; PAN, Z.L.; LIU, D.; HAN, X.B. Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 442, p. 397-403, 1998.

COSTA-CRUZ, R.R.G.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 303, p. 177-180, 2001.

COSTA-CRUZ, R.R.G.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 271-275, 2006.

DADSETAN, S.; KUKOLJ, E.; BAK, L.K.; SERENSEN, M.; OTT, P.; VILSTRUP, H.; SCHOUSBOE, A.; KEIDING, S.; WAAGEPETERSEN, H.S. Brain alanine formation as an ammonia-scavenging pathway during hyperammonemia: effects of glutamine synthetase inhibition in rats and astrocyte-neuron co-cultures. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 33, p. 1235-1241, 2013.

DAWSON, R.JR.; LIU, S.; JUNG, B.; MESSINA, S.; EPPLER, B. Effects of high salt diets and taurine on the development of hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Amino Acids**, v. 19, p. 643-655, 2000.

DOGRU-ABBASOGLU, S.; KANBAGLI, O.; BALKAN, J.; CEVIKBAS, U.; AYKAC-TOKER, G.; UYSAL, M. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20 (1), p. 23-27, 2001.

EL IDRISSE, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. **Amino. Acids**, v. 34 (2), p. 321-328, 2008.

ERICSON, M.; MOLANDER, A.; STOMBERG, R.; SÖDERPALM, B. Taurine elevates dopamine levels in the rat nucleus accumbens; antagonism by strychnine. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 3225-3229, 2006.

ESTACION, M.; WEINBERG, J.S.; SINKINS, W.G.; SHILLING, W.P. Blockade of maitotoxin-induced endothelial cell lysis by glycine and L-alanine. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 284, p. C1006-C1020, 2003.

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

FRAZÃO, M.F; MAIA, L.M.S.S; GUEDES, R.C.A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v. 4.(47), p. 26-30, 2008.

GERMANO, P.C.S.; SILVA, D.L.; SOARES, G.S.F.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: effects on cortical spreading depression in adult rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 16 (6), p. 275-281, 2013.

GREEN, T.R.; FELLMAN, J.H.; EICHER, A.L.; PRATT, K.L. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1073 (1), p. 91-97, 1995.

GROSSER, N.; OBERLE, S.; BERNDT, G.; ERDMANN, K.; HEMMERLE, A.; SCHRÖDER, H. Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 ferritin as possible mediators. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 351-355, 2004.

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**, p. 2343-2355, 2011.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M.C.; SILVA, A.T.; TEODÓSIO, N.R. Effect of dietary Lithium on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 923-925, 1989.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; TEODÓSIO, N.R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1407-1412, 1996.

GUEDES, R.C.A.; BARRETO, JM. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 4, p. 393-397, 1992.

GUEDES, R.C.A.; CABRAL-FILHO, J.E.; TEODOSIO, N.R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. In: Do Carmo, R.J. (Ed.), *Spreading Depression, Experimental Brain Research Series*. Springer, Berlin, p. 17–26, 1992.

GUEDES, R.C.A.; DO CARMO, R.J. Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental Brain Research**, v. 39 (3), p. 341-349, 1980.

GUEDES, R.C.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M.S. Effect of pre and postnatal propylthiouracil administration on propagation cortical spreading depression of adults rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 1123-1128, 1993.

GUEDES, R.C.A.; ROCHA-DE-MELO, A.; LIMA, K.R.; ALBUQUERQUE J.M.S.; FRANCISCO, E.S. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16 (4), p. 142-146, 2013

GUEDES, R.C.A.; VASCONCELOS, C.A.C. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neuroscience Letters**, v. 442, p. 118-122, 2008.

HANSEN, A.J.; OLSEN, C.E. Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 108 (4), p. 355-365, 1980.

HERNANDES, A.S.; FRANÇOLIN-SILVA, A.L.; VALADARES, C.T.; FUKUDA, M.T.H.; ALMEIDA, S.S. Effects of different malnutrition techniques on the behaviour of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 240-245, 2005.

HUXTABLE R. J. The physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**, v. 72 (1), p. 101-163, 1992.

JACOBSEN, J.G.; SMITH, L.H.JR. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiological Reviews**, v. 48 (2), p. 424-511, 1968.

JIA, F.; YUE, M.; CHANDRA, D.; KERAMIDAS, A.; GOLDSTEIN, P.A.; HOMANICS, G.E.; HARRISON, N.L. Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA_A receptors in the thalamus. **Journal of Neuroscience**, v.28 (1), p. 106-115, 2008.

JIANG, Z.; KRNJEVIC, K.; WANG, F.; YE, J.H. Taurine activates strychnine-sensitive glycine receptors in neurons freshly isolated from nucleus accumbens of young rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, p. 248–257, 2004.

KOHMEIER, M. Amino acids nitrogen compounds. In: Kohlmeier, M. (Eds), **Handbook of Nutrient Metabolism**, Elsevier Ltd, p. 308-314, 2003.

LEÃO, A.A.P. Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, p. 391-396, 1944b.

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

LEÃO, A.A.P. The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. **Journal of Neurophysiology**, v. 3 (3), p. 315-321, 1951.

LIMA, D.S.C.; MAIA, L.M.S.S.; BARBOZA, E.A.; DUARTE, R.A.; SOUSA, L.S.; GUEDES, R.C.A. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v. 85, p. 241-247, 2009.

LIMA, C.B.; SOARES, G.S.F.; VITOR, S.M.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; CASTELLANO, B.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 98-105, 2013.

LIU, J; LIU, L; WANG, X; TENG, H.; YANG, N. Antenatal supplementation of taurine for protection of fetal rat brain with intrauterine growth restriction from injury by reducing neuronal apoptosis. **Neuropediatrics**, v. 43, p. 258-263, 2012.

LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; DOS-SANTOS, E.M.; GUEDES, R.C.A. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Research**, v. 1591, p. 93-101, 2014.

MAIA, L.M.S.S.; AMANCIO-DOS-SANTOS A.; DUDA-DE-OLIVEIRA D.; ANGELIM M.K.C.; GERMANO P.C.P.; SANTOS S.F.; GUEDES R.C.A. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. **Nutritional Neuroscience**, v. 12 (2), p. 73-80, 2009.

MAYEVSKY, A.; DORON, A.; MANOR, T.; MEILIN, S.; ZARCHIN, N.; OUAKNINE, G.E. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. **Brain Research**, v. 740, p. 268-274, 1996.

MENDES-DA-SILVA, R.F.; LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; BANDIN-DA-SILVA, M.E.; CAVALCANTI, G.A.; RODRIGUES, A.R.O.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; GUEDES, R.C.A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 155-160, 2014.

MOLCHANOVA, S.M.; OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus. **Proc West Pharmacology Society**, v. 50, p. 95-97, 2007.

MONTE-GUEDES, C.K.R.; ALVES, E.V.; VIANA-DA-SILVA, E.; GUEDES, R.C.A. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing wellnourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, p. 191-94, 2011.

MORGANE, P.J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

MORGANE, P. J., MILLER, M., KEMPER, T., STERN, W., FORBES, W., HALL, R., et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.

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

MURAKAMI, T.; FURUSE, M. The impact of taurine - and beta-alanine-supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. **Amino Acids**, v. 39, p. 427-434, 2010.

NÄGELI, M.; FASSHAUER, M.; SOMMERFELD, J.; FENDEL, A.; BRANDI, G.; STOVER, J.F. Prolonged continuous intravenous infusion of the dipeptide L-alanine- L-glutamine significantly increases plasma glutamine and alanine without elevating brain glutamate in patients with severe traumatic brain injury. **Critical Care**, v. 18, p. 1-12, 2014.

OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Excitatory amino acids evoke taurine release from cerebral cortex slices from adult and developing mice. **Neuroscience**, v. 45 (2), p. 451-459, 1991

OJA, S.S.; SARANSAARI, P. Taurine and epilepsy. **Epilepsy Research**, p. S0920-1211, 2013.

OLIVEIRA, V. A.; ASSIS, A.M.; PINHEIRO, S.M.; BARRETO, M.L. Determinantes dos déficits ponderal e de crescimento linear de crianças menores de dois anos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40(5), p. 874-882, 2006.

PAN, C.; GUPTA, A.; PRENTICE, H.; WU, J.Y. Protection of taurine and granulocyte colony-stimulating factor against excitotoxicity induced by glutamate in primary cortical neurons. **Journal of Biomedical Science**, 17 (Suppl 1):S18, 2010.

PANULA-LEHTO E.; MÄKIEN, M.; AHTEE, L. Effects of taurine, homotaurine and GABA on hypothalamic and striatal dopamine metabolism. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, v. 346, p. 57-62, 1992.

PASSANTES-MORALES, H.; HERNÁNDEZ-BENÍTEZ, R. Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? **Neurochemical Research**, v. 35, p. 1939-1943, 2010.

PUSIC, D.A.; MITCHELL, H.M.; KUNKLER, P.E.; KLAUER, N.; KRAIG, R.P. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental Neurology** v. 264, p. 43-54, 2015.

RANA, S.K.; SANDERS, T.A.B. Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. **British Journal of Nutrition**, v. 56, p. 17-27, 1986.

RASGADO-FLORES, H.; MOKASHI, A.; HAWKINS, R.A. Na⁺- dependent transport of taurine in found only the abluminal membrane of the blood-brain barrier. **Experimental Neurology**, v. 233, p. 457-462, 2012.

ROYSOMMUTI, S.; WYSS, J.M. Perinatal taurine exposure affects adult arterial pressure control. **Amino Acids**, v. 46 (1), p. 57-72, 2015.

RIPPS H.; SHEN, W. Review: Taurine: a “very essential” amino acid. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2673-2686, 2012.

ROCHA-DE-MELO, A.P.; CAVALCANTI, J.B; SANTOS BARROS, AM.; GUEDES, R.C.A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9 (3/4), p. 155-160, 2006.

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

RODRÍGUEZ-NAVARRO, J.A.; GONZALO-GOBERNADO, R.; HERRANZ, A.S.; GONZALEZ-VIGUERAS, J.M; SOLÍS, J.M. High potassium induces taurine release by osmosensitive and osmoresistant mechanisms in the rat hippocampus in vivo. **Journal Neurociencia**, v. 87 (1), p. 208-217, 2009.

RODWELL, V.W. Biosynthesis of the nutritionally nonessential amino acids. In: Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (Ed), **Harper's Illustrated Biochemistry, Appleton and Lange**, Stamford, p. 237-241, 2003.

SANTOS-MONTEIRO, J.S.; TEODÓSIO, N.R.T.; GUEDES, R.C.A. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. **Nutritional Nerusociencia**, v. 1, p. 29-40, 2000.

SHELLER, D.; SZATHMARY, S.; KOLB, J.; TEGTMEIER, F. Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct. **Amino Acids**, v. 19, p. 571-583, 2000.

SCHOUSBOE, A.; SONNEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, H.S. Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons. **Neurochemical International**, v. 43, p. 311-315, 2003.

SCHULLER-LEVIS, G.B.; PARK, E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. **Neurochemical Research**, v. 29 (1), p. 117-126, 2004.

STAPLETON, P.P.; O'FLAHERTY, L.; REDMOUND, P.; BOUCHIER, J.J. Review: Host defense-a role for the amino acid taurine? **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22 (1), p. 42-48, 1998.

SUN, M.; ZHAO, Y.; GU, Y.; XU, C. Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. **Amino Acids**, v. 42, p. 1735-1747, 2012.

SVED, D.W.; GODSEY, J.L.; LEDYARD, A.L.; MAHONEY, A.P.; STETSON, P.L.; HO, S.; MYERS, N.R.; RESNIS, P.; RENWICK, A.G. Absorption, tissue distribution, metabolism and elimination of taurine given orally to rats. **Amino Acids**, v. 32, p. 459-466, 2007.

TAMAI, I.; SENMARU, M.; TERASAKI, T.; TSUJI, A. Na⁺- and Cl⁻ dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. **Biochemical Pharmacology**, v. 50 (11), p. 1783-1793, 1995.

TARANUKHIN, A.G.; TARANUKHINA, E.Y.; DJATCHKOVA, I.M.; SARANSAARI, P.; PELTO-HUIKKO, M.; OJA, S.S. Taurine protects immature cerebellar granular neurons against acute alcohol administration. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 643, p. 159-167, 2009.

TARANUKHIN, A.G.; TARANUKHINA, E.Y.; SARANSAARI, P.; DJATCHKOVA, I.M.; PELTO-HUIKKO, M.; OJA, S.S. Taurine reduces caspase-8 and caspase-9 expression induced by ischemia in the mouse hypothalamic nuclei. **Amino Acids**, v. 34, p. 169-174, 2008.

TENORIO, A.S.; OLIVEIRA, I.D.V.A.; GUEDES, R.C.A. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 431-437, 2009.

TIEDJE, K.E.; STEVENS, K.; BARNES, S.; WEAVER D.F. β -alanine as a small molecule neurotransmitter. **Neurochemistry International**, v. 57, p. 177-188, 2010.

TOSH, D.N.; FU, Q.; CALLAWAY, C.W.; MCKNIGHT, R.A.; MCMILLEN, I.C.; ROSS, M.G.; LANE, R.H.; DESAI, M. Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, p. G1023–G1029, 2010.

TRACHTMAN, H.; FUTTERWEIT, S.; MAESAKA, J.; MA, C.; VALDERRAMA, E.; FUCHS, A.; TARECTECAN, A.A.; RAO, P.S.; STURMAN, J.A.; BOLES, T.H.; et al. Taurine ameliorates chronic streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 269 (3), p. 429-438, 1995.

TRINDADE-FILHO, E.M.; VASCONCELOS, C.A.; GUEDES, R.C.A. Acute tryptophan administration impairs cortical spreading depression propagation in RE sleep deprived and non-deprived adult rats. **Psychology Neuroscience**, v. 2, p. 235-241, 2009.

VASCONCELOS, C.A.; DE OLIVEIRA, J.A.F.; DE OLIVEIRA COSTA L.A.; GUEDES, R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 163-170, 2004.

WAAGEPETERSEN, H.S.; SONNEWALD, U.; LARSSON, O.M.; SCHOUSBOE, A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 471–479, 2000.

WESTERGAARD, N.; VARMING, T.; PENG, L.; SONNEWALD, U.; HERTZ, L.; SCHOUSBOE, A. Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. **Journal of Neuroscience Research**, v. 35, p. 540– 545, 1993.

WEI, Y.; ULLAH, G.; SCHIFF, S.J. Unification of neuronal spikes, seizures, and spreading depression. **Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 11733-11743, 2014.

WU, H.; JIN, Y.; WEI, J.; JIN, H.; SHA, D.; WU, J.U. Mode of action of taurine as a neuroprotector. **Brain Research**, v. 1038 (2), p. 123-131, 2005.

WU, J.Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **Journal of Biomedical Science**, v. 17 (Suppl. 1): S1, 2010.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R.C.A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, p. 1277-1281, 1991.

ANEXO

ANEXO A – Confirmação da submissão do artigo ao periódico

em.amac.0.420e76.6fc1dc14@editorialmanager.com

em nome de Amino Acids (AMAC)

para Elian da Silva Francisco

qui, 26 de mar 17:48

Amino Acids - Submission Notification to co-author

Re: "Neonatal taurine and alanine decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes"

Full author list: Elian da Silva Francisco, MS; Rubem C.A. Guedes, PhD

Dear MS Elian Francisco,

We have received the submission entitled: "Neonatal taurine and alanine decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes" for possible publication in Amino Acids, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Prof. Rubem C.A. Guedes who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

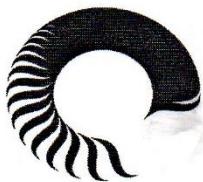
Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

Amino Acids

ANEXO B – Parecer 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, 29 de janeiro de 2015.

Ofício nº 03/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araujo Guedes**
Departamento de Nutrição - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.021609/2013-67

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Tratamento crônico com taurina e alanina e desenvolvimento cerebral em ratos: efeitos sobre a depressão alastrante cortical”**.

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

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

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

Origem dos animais: biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 7-120 dias; Peso: 15-400g; Sexo: machos; O processo encontra-se aprovado, mas houve solicitação de mais animais para continuidade do projeto. Nº total de animais: 150.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584