

SUÊNIA MARCELE VITOR DE LIMA

Ação eletrofisiológica cerebral do glutamato monossódico em ratos em desenvolvimento: o papel da via de administração e do exercício físico sobre a depressão alastrante cortical

Recife-PE

2016

SUÊNIA MARCELE VITOR DE LIMA

Ação eletrofisiológica cerebral do glutamato monossódico em ratos em desenvolvimento: o papel da via de administração e do exercício físico sobre a depressão alastrante cortical

Dissertação apresentado 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: Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes

Recife-PE
2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

L732m Lima, Suênia Marcelle Vitor de.
Ação eletrofisiológica cerebral do glutamato monossódico em ratos em desenvolvimento: o papel da via de administração e do exercício físico sobre a depressão alastrante cortical / Suênia Marcelle Vitor de Lima. – 2016.
80 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2016.
Inclui referências e apêndices.

1. Cerebro - Desenvolvimento. 2. Glutamato de Sódio. 3. Exercício. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-0149)

SUÊNIA MARCELE VITOR DE LIMA

Ação eletrofisiológica cerebral do glutamato monossódico em ratos em desenvolvimento: o papel da via de administração e do exercício físico sobre a depressão alastrante cortical

Dissertação aprovada em: 19 de fevereiro de 2016

Prof. José Antônio dos santos / UFPE

Prof.^a Elizabeth do nascimento / UFPE

Prof.^a Ângela Amâncio dos Santos / UFPE

Recife

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, Gilson e Maria (Marcela), pelo imenso amor e cuidado que me dedicaram ao longo de toda minha vida. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós tinha atingido antes. Mas este orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de dia após dia ser mais digna de representá-los. Obrigada por tudo!!!

Ao meu amado esposo, Marcos, pelas compreensões inestimáveis, pelos diversos sacrifícios suportados e por me fazer acreditar que no final tudo daria certo. O seu apoio e companheirismo tornaram simples as minhas dificuldades. Juntos, chegamos até aqui, e juntos, conquistaremos muito mais!!!

Aos meus sogros, Maria das Neves e Marcos José, pelo afeto, apoio e incentivo.

À minha família que soube entender a minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no mestrado.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes, por acreditar em mim, e me conduzir de maneira tão sábia, desde a iniciação científica até o mestrado. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, um grande exemplo de profissional. Terei sempre orgulho em dizer que um dia fui sua orientanda.

À Dra. Cássia Borges de Lima, pela gentileza ao me ensinar os primeiros passos na pesquisa científica. Muito obrigada pelos conselhos, companheirismo, carinho e amizade.

A todos do LAFINNT, Nora, Elian, Rosângela, Andréia, Denise, Mariana, Paula, e aos demais que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa. Foi muito

trabalho, mas em um ambiente tranqüilo, de respeito e cooperação mútua, tudo se tornou mais prazeroso.

Às companheiras de laboratório, Larissa e Regina, que participaram diretamente deste trabalho me dando apoio técnico e emocional, com certeza sem a cumplicidade e carinho de vocês teria sido mais difícil.

Agradeço às estagiárias, Nahara Oliveira e Catarina Nicácio, pelas múltiplas contribuições realizadas com dedicação e responsabilidade.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Ao técnico do Biotério *Edeones França*, Sr França, pelo apoio técnico excepcional.

Gostaria também de agradecer aos professores que fizeram parte da banca examinadora da minha qualificação: Prof.^a Dra. Ângela Amâncio dos Santos, Prof.^a Dra. Luciana Maria Silva de Seixas Maia e ao Prof. Ricardo Abadie Guedes, e aos professores membros titulares da banca que aprovaram por unanimidade esta dissertação, Prof.^a Dra. Elizabeth do Nascimento, Prof.^a Dr. Ângela Amâncio e ao Prof. Dr. José Antônio, que cederam uma parte de seu tempo precioso para poder contribuir com este trabalho.

À pós-graduação em nutrição e ao órgão de fomento CNPq. pelo auxílio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos, a todos que foram de alguma forma responsável por essa vitória tão esperada ao longo desses dois anos. Que Deus os retribua com louvor.

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Glutamato monossódico (MSG) é um aminoácido neuroexcitatório utilizado como reforçador do sabor dos alimentos. Está envolvido em diversos processos neuropatológicos, através do mecanismo chamado excitotoxicidade. Por outro lado, o exercício físico induz efeitos positivos no sistema nervoso de mamíferos. Neste trabalho, investigamos, em ratos sedentários e exercitados, os efeitos neurais do MSG, administrado por via orogástrica (gavagem) ou por aplicação tópica cerebral. Ratos Wistar receberam MSG (2 ou 1g/kg, respectivamente; grupos MSG-2 e MSG-1), ou água (grupo controle), nos dias pós-natais (P) 7 a 27. No P28-33, os três grupos foram subdivididos em exercitados (esteira motorizada, 3 semanas, 5 dias/semana, 30 minutos/dia) ou sedentários. No P53-60, sob anestesia, registramos o fenômeno designado como depressão alastrante cortical (DAC). Como observado previamente (tratamento subcutâneo), o tratamento com MSG por gavagem aumentou a velocidade da DAC de maneira dose-dependente comparado com grupo controle. O exercício diminuiu essa aceleração, sugerindo que exerceu influência no desenvolvimento e função cerebral. Três grupos adicionais sem tratamento prévio receberam, durante o registro da DAC, aplicação tópica cortical de MSG em três concentrações (25, 50 e 75 mg/ml). O MSG tópico, ao contrário da gavagem, reduziu a velocidade da DAC de forma reversível, dependente da concentração. Os resultados opostos (MSG por gavagem facilitou, e topicamente dificultou a DAC) sugerem mecanismos de atuação diferentes. Sugere-se cuidado em utilizar MSG como reforçador do sabor dos alimentos, principalmente no organismo em desenvolvimento.

Palavras-chave: Desenvolvimento cerebral. Glutamato monossódico. Exercício físico. Depressão alastrante cortical.

ABSTRACT

Monosodium glutamate (MSG) is an excitatory amino acid used as a food flavor enhancer ("flavoring agent"). MSG administered to newborn rats in systemic and repetitive way is involved in a wide range of pathological processes, through the mechanism called excitotoxicity. On the other hand, exercise induces a positive effect on the mammalian nervous system. In this work, we investigated the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD), in rats treated with MSG and/or treadmill exercise. In addition, we studied the effect of cortical topical treatment with MSG on the CSD parameters. Wistar rats received per gavage MSG (2 or 1g / kg, respectively; MSG-2 and MSG-1 groups) or water (control group) in postnatal days (P) 7 to 27. In P28-33, the three groups were subdivided in exercised (treadmill, 3 weeks, 5 days/week, 30 minutes/day) or sedentary. At P53-60, we recorded the CSD and analyzed its propagation velocity, amplitude and duration. Confirming previous observations, MSG administered per gavage increased the CSD velocity in a dose-dependent manner compared with control group, and the treadmill exercise diminished this acceleration, suggesting that it influenced brain development and functioning. Three additional groups, previously untreated, were used to investigate the effect of topical application of three different concentrations of MSG (25, 50 and 75 mg/ml) during the electrophysiological recording. In contrast to the gavage treatment, topical treatment with MSG reduced significantly and reversibly the CSD propagation velocity. The opposite results suggest different mechanisms for gavage and topical action of MSG. Data suggest caution in the use of MSG as a reinforcer of food flavor, especially in the developing organism.

Keywords: Brain Development. Monosodium glutamate. Physical exercise.
Cortical spreading depression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Neurotransmissão glutamatérgica	18
Figura 2. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da DAC	25
Figura 3. Representação esquemática dos grupos que receberam MSG sistemicamente submetidos ou não ao exercício físico	34
Figura 4. Representação esquemática do protocolo de exercício físico	35
Figura 5. Esquema do registro eletrofisiológico da DAC	36
Figura 6. Diagrama do protocolo para aplicação tópica cortical do MSG	38

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Protocolo de aplicação tópica de MSG	46
Figura 2. Pesos corporais dos grupos experimentais	47
Figura 3. Registros eletrofisiológicos dos animais	48
Figure 4. Velocidade de propagação da DAC dos grupos que receberam MSG sistemicamente e foram submetidos ou não ao exercício	50
Figure 5. Velocidade de propagação da DAC dos grupos que receberam MSG topicamente durante o registro eletrofisiológico	52

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Amplitude e duração da DAC dos grupos que receberam MSG sistemicamente e foram submetidos ou não ao exercício	50
Tabela 2. Amplitude da DAC dos grupos que receberam MSG topicamente durante o registro eletrofisiológico	51
Tabela 3. Duração da DAC dos grupos que receberam MSG topicamente durante o registro eletrofisiológico	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMPA	2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico ácido
ALC	Ácido Linoléico Conjugado
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
Ca ²⁺	Cálcio
DBR	Dieta Básica Regional
DAC	Depressão Alastrante Cortical
EcoG	Eletrocorticograma
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitatórios
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido γ-aminobutírico
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Glu-R	Receptores de glutamato
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
mGluRs	Receptores metabotrópicos
MSG	Monosodium glutamate
NMDA	N-metil-D-aspartato
NAH	Núcleo arqueado do hipotálamo
PTZ	Pentilenotetrazol
SRC	Síndrome do restaurante chinês
SNC	Sistema nervoso central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VGLUTs	Transportadores vesiculares de glutamato
VLV	Variação lenta de voltagem

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Glutamato monossódico	16
2.2 Exercício físico	22
2.3 Depressão alastrante cortical	25
3. HIPÓTESES	30
4. OBETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Animais	32
5.2 Delineamento experimental	32
5.3 Determinações de peso corporal	34
5.4 Tratamento sistêmico com glutamato monossódico	34
5.5 Descrição do exercício físico em esteira	35
5.6 Registro da depressão alastrante cortical	36
5.7 Tratamento tópico cortical com glutamato monossódico	37
5.8 Eutanásia	38
5.9 Análise estatística	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO - ARTIGO ORIGINAL	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7.1 Perspectivas	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXO - A	79
ANEXO - B	80

1. APRESENTAÇÃO

O glutamato monossódico, também conhecido como MSG (sigla do inglês - monosodium glutamate), é o sal sódico do ácido glutâmico. Desde 1909 o MSG vem sendo comercializado pela indústria alimentícia como realçador de sabor, aumentando a palatabilidade dos alimentos e consequentemente o seu consumo (YAMAGUCHI e NINOMIYA 2000; MOURITSEN, 2012). O MSG é historicamente relacionado à chamada “síndrome do restaurante chinês” (FREEMAN, 2006) em que alguns sintomas desagradáveis foram desencadeados após ingestão de alimentos contendo glutamato monossódico (GEHA et al. 2000). Após este ocorrido, o MSG se tornou o foco de muitas investigações na área científica, para esclarecer se há fundamento relacionar os sintomas descritos pela síndrome do restaurante chinês ao consumo de MSG (GEHA a, b, et al., 2000)

O glutamato (aminoácido componente deste sal) exerce papel fisiológico fundamental como principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central e está envolvido em processos fisiológicos e patológicos importantes (ZHOU e DANBOLT, 2014; KOGA et al., 2011). Diversos autores têm estudado os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no dano neuronal induzido por aumento da atividade glutamatérgica. Um dos possíveis mecanismos seria pela maior ativação dos receptores de glutamato (Glu-R) (WANG e QIN, 2010; MEHTA et al., 2013). Estudos sugerem que a administração de MSG está relacionada ao mecanismo molecular da neurotoxicidade (GUDIÑO-CABRERA et al., 2014).

O desencadeamento dos efeitos neurotóxicos do MSG tem sido atribuído a um aumento sustentado nas concentrações de glutamato extracelular cerebral (LÓPEZ-PÉREZ, et al. 2010). Assim, um importante fator, que pode interferir na biodisponibilidade do glutamato a partir do MSG é a via de administração, uma vez que ela pode produzir resultados similares (DIEF et al., 2014) ou diferentes (BOGDANOV e WURTMAN, 1996). Além disso, a extensão da neurotoxicidade induzida pelo MSG parece estar relacionada à dose administrada, tem sido observado que quanto maior a dose administrada maior o dano neuronal (MUSA e SUNDAY, 2013).

Os benefícios do exercício sobre o cérebro têm sido reconhecidos há séculos, mas apenas nas últimas duas décadas a pesquisa científica tem sido rigorosamente fundamentada, mostrando seu efeito benéfico à saúde cerebral e função cognitiva sob condições normais e adversas (VAYNMAN E GOMEZ-PINILLA, 2005; CASSILHAS et al., 2015; PIN-BARRE

e LAURIN, 2015). A associação MSG-exercício pode causar uma série de efeitos metabólicos em animais exercitados por natação e por corrida em esteira (ANDREAZZI et al, 2009; MIRANDA et al, 2013; LIMA et al, 2014). À semelhança do que ocorre com o MSG, o exercício físico tem o córtex cerebral como uma importante área-alvo para as suas ações. Em contraste com o conhecimento das alterações metabólicas provocadas pelo MSG administrado no período neonatal, são escassas as informações na literatura acerca da atividade eletrofisiológica cerebral de animais submetidos aos efeitos neurais da associação MSG-Exercício. Portanto, em virtude disso, decidimos investigar, se a administração oro-gástrica de MSG, no período neonatal, associado ou não ao exercício físico, influencia a propagação do fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC), visando a comparação com trabalho anterior (LIMA et al., 2014), no qual se aplicou o MSG subcutaneamente. Adicionalmente, pretende-se aplicar topicamente o MSG no córtex cerebral, durante o registro eletrofisiológico da DAC, para efeito de comparação entre as vias de administração (subcutânea e oro-gástrica).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Glutamato Monossódico

O glutamato (forma ionizada do ácido glutâmico) é um aminoácido não essencial, ou seja, pode ser produzido a partir de outros compostos celulares. É encontrado em muitos alimentos e organismos vivos, seja na sua forma ligada (componente das proteínas e peptídios) ou livre. Em sua forma livre, o glutamato é detectado por receptores gustativos encontrados na cavidade oral, proporcionando o quinto sabor básico, umami, único, distinto dos outros quatro sabores básicos (salgado, doce, amargo e azedo), e que significa em japonês “delicioso” (MOURITSEN, 2012). Por esse motivo, o glutamato é empregado frequentemente pela indústria de alimentos como realçador de sabor (JINAP e HAJEB, 2010). A forma mais comum de utilização deste aminoácido como aditivo alimentar, é através do glutamato monossódico, também conhecido como MSG (sigla do inglês - monosodium glutamate).

Quando adicionado aos alimentos, o MSG se dissocia e torna-se livre para conferir mais umami, realçando e harmonizando o sabor de caldos, sopas, molhos, entre outros produtos que o contém (YAMAGUCHI e NINOMIYA, 2000). Dessa forma, possui o mesmo papel sensorial do glutamato livre de ocorrência natural; a única diferença entre a molécula de ácido glutâmico e de MSG é o sódio. O químico japonês Kikunae Ikeda foi pioneiro na identificação do glutamato como componente umami nos alimentos. Em 1909, ele conseguiu isolar, purificar e rapidamente obter a patente de produção industrial do MSG, que atualmente é usado em todo o mundo como realçador de sabor em uma ampla variedade de produtos alimentícios (SANO, 2009).

A ingestão média diária de MSG é estimada em 0,3-1,0 g/dia em países industrializados, mas, pode ser maior, dependendo do teor de MSG nos itens alimentares e preferências individuais de sabor, as quais podem variar de acordo com a genética e interação gene-ambiente (GEHA et al., 2000a, BELLISLE, 2008). Na Ásia, especialmente no Japão e na Coreia, sais de glutamato são utilizados mais intensamente do que na Europa. Nestes países, a ingestão de aminoácido como aditivo alimentar é estimado em 1,2-1,7 g/dia (JINAP e HAJEB, 2010). Comitês Científicos e/ou Agências de Regulamentação como o Comitê misto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) “não especificada” para o MSG (WALKER, 1999). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA) se baseia nos estudos realizados pelo JECFA e FDA (Food and Drug Administration) e não estabelece restrições para a utilização do MSG pela indústria de alimentos. Contudo, os fabricantes sugerem recomendações tecnológicas entre 0,1% a 0,8 % no alimento pronto para consumo, uma vez que o gosto umami, em excesso, compromete a aceitação sensorial dos alimentos (BEYREUTHER et al.; 2007).

Em 1968, um relatório apareceu no *New England Journal of Medicine*, descrevendo diversos sintomas em pacientes, que jantaram em restaurantes chineses. Tais sintomas ficaram conhecidos como síndrome do restaurante chinês (SRC) e incluíam: dormência, irradiando para as costas, braços e pescoço; fraqueza; palpitações; sensação de aperto; rubor; lacrimejamento, tonturas; síncope e pressão facial (GEHA et al., 2000b, FREEMAN, 2006). Os autores originais sugeriram possíveis culpados para a SRC, como o vinho, teor de sódio, e o MSG, porém, o que mais atraiu atenção como um possível desencadeador dos sintomas, foi o MSG (FREEMAN, 2006). Assim, o MSG tornou-se o aditivo alimentar mais intensivamente estudado, especialmente pelo fato de que o glutamato é o principal transmissor excitatório no cérebro (ZHOU e DANBOLT, 2014).

O glutamato, como mediador da transmissão sináptica excitatória no sistema nervoso central (SNC), participa de uma grande variedade de processos fisiológicos, desempenhando importante papel na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória; atuando também como mediador de informações sensoriais, coordenação motora e emoções (SANACORA et al., 2008); bem como em condições patológicas, tais como: a epilepsia, isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esquizofrenia (KOGA et al., 2011; WANG e QIN, 2010). É também precursor para o GABA (ácido γ -aminobutírico) em neurônios GABAérgicos e para glutamina em células gliais; constituinte de proteínas e peptídeos, ex. glutatona (γ -glutamil-cisteil-glicina), a qual é o maior agente de defesa contra estresse oxidativo nas células (KOGA et al., 2011; DANBOLT, 2001). A sinalização do glutamato é mediada por receptores glutamatérgicos ionotrópicos, N-metil-D-aspartato (NMDA), 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónicoácido (AMPA) e ácido kaínico, ou seu sal kainato e pelos receptores metabotrópicos (mGluRs), os quais são receptores acoplados à proteína G e conduzem fluxo de íons (ZHOU e DANBOLT, 2014). O sistema de neurotransmissão glutamatérgica está representado esquematicamente na figura 1.

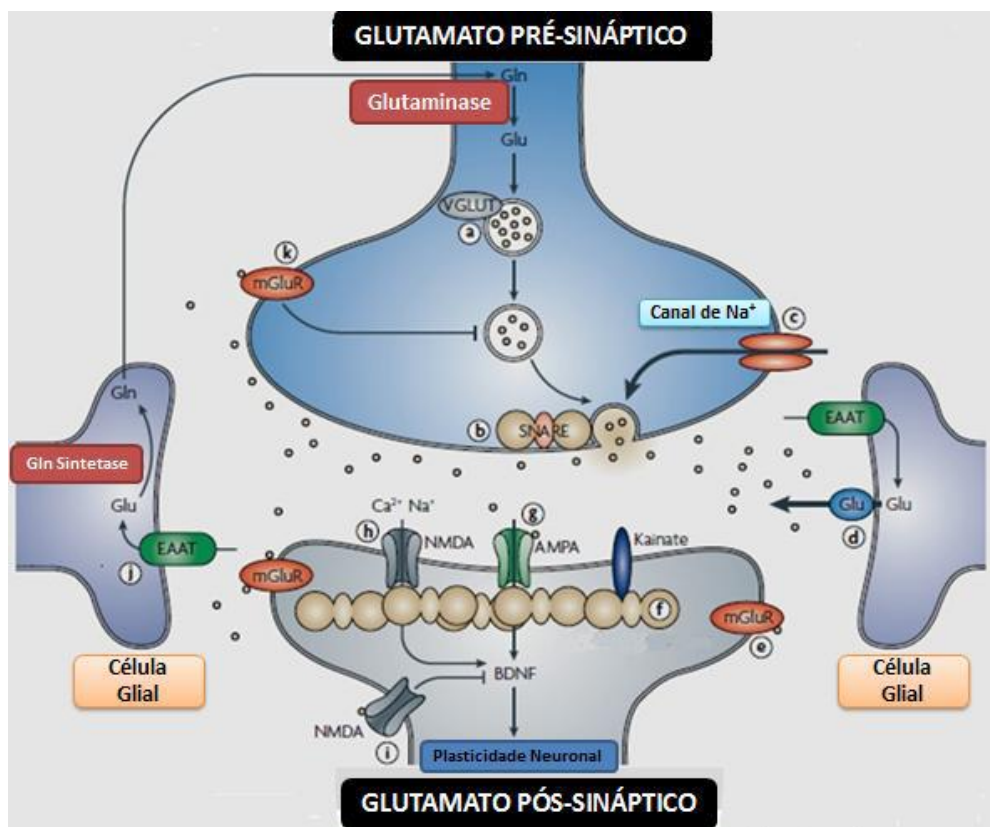


Figura 1. Neurotransmissão glutamatérgica. Glutamina (Gln) é convertida a glutamato (Glu) pela ação da glutaminase. Glu é empacotado em vesículas pré-sinápticas pelos transportadores Glu vesiculares (VGLUTs) e liberados pelo neurônio de uma forma dependente de atividade através de interações com proteínas SNAREs. Glu é retirado do espaço extracelular através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) presentes predominantemente em células gliais. Em células gliais Glu é convertido a Gln pela Gln sintetase. Vários receptores glutamatérgicos estão presentes em neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos, bem como sobre as células gliais. Estes incluem os receptores ionotrópicos - AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), NMDA (N-metil-D-aspartato), e receptores de cainato - bem como receptores metabotrópicos (mGluRs). FONTE: SANACORA et al. (2008).

Múltiplos níveis de regulação evoluíram para assegurar que a excitação glutamatérgica seja mantida dentro de limites estreitos, os quais proporcionam uma função neuronal ótima e evitam uma sobreativação do sistema, que pode causar excitotoxicidade. Um fator crucial na manutenção da homeostase do glutamato é o equilíbrio entre a sua liberação e eliminação (SANACORA et al., 2008). Desde o início do desenvolvimento da idéia da excitotoxicidade, o dogma central tem sido que o dano celular induzido por glutamato e a morte celular são o resultado da superativação dos receptores de aminoácidos excitatórios. A subclasse de receptores ionotrópicos para glutamato do tipo NMDA é a mais seletiva e mais efetiva que as demais em mediar danos neurodegenerativos (FLORES-SOTO et al., 2013). A superativação deste receptor pelo glutamato acarreta em aumento no influxo de cálcio (Ca^{2+}), e níveis

anormais deste íon são responsáveis pelo fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica que leva a estresse oxidativo, dano mitocondrial e morte celular (MEHTA et al., 2013).

Embora vários agonistas glutamatérgicos específicos possam imitar os efeitos tóxicos do glutamato, o MSG é possivelmente o agente mais comum que pode ser usado para caracterizar o mecanismo celular e molecular envolvidos na excitotoxicidade (WANG e QIN, 2010). Isso, porque o MSG induz superestimulação de todos os tipos de receptores glutamatérgicos no SNC, os quais são similares aos efeitos que ocorrem *in vivo*, e dessa forma permite temporariamente seguir processos degenerativos desencadeados por estímulos excitotóxicos. O dano neuronal atinge não só os receptores de glutamato pós-sinápticos, como também os astrócitos (OTA et al., 2013); oligodendrócitos (MATUTE, 2002) células endoteliais (ANDRAS et al., 2007) e microglia (MURUGAN et al., 2013). Quando astrócitos se tornam reativos devido à lesão, desordens ou degeneração, há rápido aumento de RNAm da proteína GFAP (proteína glial fibrilar ácida), uma proteína de filamento intermediário encontrada no citoplasma de astrócitos maduros no SNC (YANG E WANG, 2015). Os astrócitos reativos localizados em torno e no interior da área submetida ao dano exibem uma variedade de alterações morfológicas, incluindo hipertrofia do seu corpo celular, extensões de processos, e o aumento da produção de fatores tróficos e citocinas que podem promover a sobrevivência celular (HANBURY et al., 2003). Em ratos tratados com MSG nas doses de 2g/Kg e 4g/Kg de peso corporal observou-se astrócitos alterados morfolologicamente com a expressão de GFAP na região CA1 do hipocampo, sugerindo um efeito neuroprotetor em resposta aos efeitos nocivos do MSG (KRAWCZYK et al., 2015). Além disso, o tratamento neonatal com MSG induziu hiperplasia e hipertrofia da microglia e astrócitos nas células do córtex cerebral e hipocampo de ratos adultos (MARTINEZ-CONTRERAS et al., 2002). Estas alterações morfológicas desencadeadas pelo MSG provavelmente influenciam a atividade elétrica do cérebro (SADEGHIAN et al., 2012), como demonstrado recentemente por nosso laboratório (LIMA et al., 2014).

Um fator importante que deve ser levado em consideração é a relação entre a extensão da absorção do MSG para a circulação e seu potencial papel neurotóxico. Assim, vários fatores influenciam os níveis máximos de glutamato plasmático, e seu potencial efeito excitotóxico, incluindo: a via de administração (BOGDANOV e WURTMAN, 1996; DIEF et al., 2014); a concentração de MSG na solução administrada (LIMA et al., 2013; MUSA e SUNDAY, 2013); ingestão de MSG adicionado a dieta comercial [os níveis plasmáticos parecem ser atenuados quando MSG é adicionado à ração, ao invés da administração aguda dado por gavagem (MONNO et al., 1995)]; idade, animais recém-nascidos são mais

susceptíveis do que animais adultos (GARATTINI, 2000); e o sexo, uma vez que o MSG exerce atividades excitotóxicas e implica em estresse oxidativo, a diferença de gênero pode ser explicada pela atividade antioxidante de estrógenos e pelo seu potencial papel neuroprotetor (CUZZOCREA et al., 2001; LIU et al., 2015).

Alguns processos podem contribuir para a falta de efeito após consumo dietético de MSG, tais como: metabolismo do glutamato no intestino e no fígado (BLACHIER et al., 2009), o seu efluxo ativo a partir do cérebro por sistemas de transporte da barreira hematoencefálica, e a atividade de sistemas de captação de glutamato de natureza neuronal e/ou glial (GREWER et al., 2014). Em contrapartida, Eweka e Om'Iniabohs, (2008), têm relatado possíveis efeitos neurotóxicos do MSG sobre o colículo superior (um dos centros de retransmissão visual) de ratos adultos, após receberem 3g e 6g de MSG misturado ao seu alimento por um período de quatorze dias. Embora animais neonatos expressem maior susceptibilidade às ações neurais do MSG (GUDINÕ-CABRERA et al., 2014), MCCALL et al., (1979) mostraram que em ratos adultos, após 30 minutos da administração de MSG por gavagem (4 g/kg peso corporal), ocorreu ruptura da barreira hematoencefálica devido a seus efeitos hipertônicos, sugerindo ainda que este pode ser um pré-requisito para o MSG produzir neurotoxicidade, e pode explicar porque em algumas situações o MSG não produz lesões cerebrais.

A administração sistêmica de MSG em animais neonatais é um modelo que permite estudar não apenas os mecanismos implicados na indução de dano neuronal excitotóxico, mas também as conseqüências em curto e longo prazo deste processo sobre o SNC. Sob estas condições, HU et al., 1998 demonstraram que a administração subcutânea de MSG (0,2 mg/g peso corporal) aumentou os níveis plasmáticos de glutamato até 17 vezes em relação aos níveis basais, acompanhado do aumento nas subunidades de receptores glutamatérgicos em neurônios lesionados, embora os danos permanecessem confinados à região ventral do núcleo arqueado do hipotálamo (NAH). Dose ainda maior, 4 mg/g causou neurodegeneração ao longo de toda a região do NAH. Assim, sugere-se que quanto maior a dose administrada, mais significativos serão os danos neuronais a várias regiões cerebrais, com efeitos em longo prazo como demonstrado por González-Burgos et al., 2009. Essa informação pode ser muito relevante se considerarmos que os níveis elevados de glutamato no cérebro podem ser um fator de neurodegeneração e morte neuronal (WANG e QIN, 2010).

Além do MSG, substâncias, aplicadas por diferentes vias de administração, levam a efeitos distintos no metabolismo e no sistema nervoso. Conforme VISSIENNON et al.,

(2012), a atividade ansiolítica dos flavonóides Quercetina e Caempferol foi detectada apenas após a administração por via oral; sem expressar efeitos ansiolíticos quando esses flavonóides foram administrados via intraperitoneal. Isso sugere a importância da via de administração na atividade biológica desses flavonóides. HOLDER e YIRMIYA (1989) demonstraram que o aspartame foi capaz de causar efeitos adversos quando ofertados intraperitonealmente, e não quando administrado oralmente.

Alguns processos neuroprotetores têm sido estudados experimentalmente, em animais de laboratório, com o intuito de reverter pelo menos em parte, as alterações neuroendócrinas e comportamentais induzidas pela toxicidade do MSG. A vitamina C, conhecida mundialmente por seu efeito antioxidante, atenuou os efeitos neurotóxicos sobre neurônios e astrócitos do córtex cerebelar, gerados pelo tratamento de 3 g/kg/dia de MSG administrado via consumo dietético (HASHEM et al., 2012). Adicionalmente, a vitamina C também teve efeito benéfico contra as injúrias ao fígado causada pelo tratamento com MSG (6 mg/g/peso corporal) adicionado a comida comercial (EL-MEGHAWRY EL-KENAWY et al., 2013). Pentametilquercetina, um flavonóide polimetoxilado, desempenhou efeitos benéficos contra os distúrbios metabólicos induzidos pelo tratamento subcutâneo de MSG (3 mg/g peso corporal) em camundongos neonatos, os quais exibiram obesidade significativa, resistência à insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia (SHEN et al., 2012). Extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) reverteu o efeito neurotóxico da administração crônica de MSG (4 g/kgde peso corporal) via intraperitoneal, sobre o conteúdo de Epinefrina, Norepinefrina, Dopamina e Serotonina (WAGGAS, 2009). Hunt et al., (2010) demonstraram que o Ácido Linoléico Conjugado (ALC) protegeu neurônios corticais embrionários de morte excitotóxica causada pela exposição à concentração de glutamato 3 μ M (1 h) em um meio de cultura. Adicionalmente, Vitamina E, vitamina C e a quercetina mostraram ser eficazes na melhoria dos efeitos oxidativos do MSG sobre o fígado, rim e cérebro de ratos (FAROMBI e ONYEMA 2006). Além disso, o ambiente enriquecido foi capaz de diminuir o atraso neurocomportamental causado pela neurotoxicidade neonatal induzida pelo MSG (HORVATH et al., 2013). Dessa forma, investigar estratégias não farmacológicas, a exemplo do exercício físico, como um possível agente neuroprotetor contra as ações do MSG, se faz necessário.

2.2 Exercício Físico

A atividade física tem sido apontada como componente essencial para a longevidade e a qualidade de vida em seres humanos. Indivíduos que rotineiramente se exercitam beneficiam-se de uma expectativa de vida maior (SAVELA et al., 2010; LEE et al., 2014). A Atividade física é definida como o movimento do corpo produzido pelo sistema muscular esquelético, que resulta em quantidades variadas de gasto energético. O gasto energético está positivamente relacionado com o condicionamento físico, dependendo dos estímulos característicos da atividade, como tipo, intensidade, regularidade e tempo despendido. O exercício, por sua vez, é uma forma específica de atividade física, estruturada e repetitiva, que possui o objetivo de melhorar ou manter o condicionamento físico e a saúde (DISHMAN et al., 2006; DESPRÉS, 2015).

Dentre as adaptações fisiológicas impostas pelo exercício físico, as mais conhecidas são as ocorridas no sistema cardiovascular, como a bradicardia no repouso e a melhora do controle da pressão arterial em indivíduos hipertensos (NEGRAO et al., 1992; ANGELIS et al., 2004; KARACABEY, 2005). Além das influências sobre o sistema cardiovascular, alterações importantes sobre o metabolismo corporal também estão bem estabelecidas na literatura. O exercício é capaz de promover alterações na composição corporal, agindo como indutor de melhoras no perfil lipídico e de promover a manutenção da homeostase glicêmica, aumentando a sensibilidade periférica à insulina e a captação de glicose (DENGEL et al., 1998; BOULE et al., 2001; LAKKA e LAAKSONEN, 2007). Em modelos animais, o exercício físico ajuda na prevenção de distúrbios em parâmetros autonômicos, hemodinâmicos e metabólicos associados à síndrome metabólica (MORAES-SILVA et al., 2013). Nos seres humanos, o exercício tem efeitos favoráveis sobre todos os componentes dessa síndrome (MONTESI et al., 2013).

Os benefícios do exercício sobre o cérebro têm sido reconhecidos há séculos, mas apenas nas últimas duas décadas a pesquisa científica tem sido rigorosamente fundamentada, mostrando seu efeito benéfico à saúde cerebral e função cognitiva sob condições normais e adversas (VAYNMAN E GOMEZ-PINILLA, 2005; CASSILHAS et al., 2015; PIN-BARRE e LAURIN, 2015). Em um contexto adaptativo, a plasticidade consequente ao exercício, permite que o sistema nervoso central adquira novas funções, modificando elementos constitutivos de seu meio interno e a conectividade em resposta ao ambiente, beneficiando tanto humanos quanto roedores (BERCHTOLD et al., 2010; SUMEC et al., 2015).

Os mecanismos relacionados aos efeitos do exercício físico sobre o SNC compreendem uma série de eventos incluindo o aumento da neurogênese hipocampal (YAU et al., 2014); aumento do volume hipocampal (VARMA et al., 2015) bem como seu funcionamento (CHANG et al., 2012). Além dos efeitos sobre a citoarquitetura hipocampal, o exercício físico aumenta os níveis de proteínas sinápticas, como sinapsinas e sinaptofisinas (GARCIA et al., 2012), e também é capaz de induzir aumento de subunidades de receptores glutamatérgicos (REAL et al., 2010; STAPLES et al., 2015). Esses resultados reforçam ainda mais a idéia de que o exercício físico pode modular estruturalmente e funcionalmente o sistema nervoso. O mecanismo molecular mais citado subjacente à neuroproteção induzida pelo exercício físico compreende uma série de eventos que favorecem o aumento da expressão e concentração de fatores neurotróficos, tais como: fator neurotrófico derivado de células da glia (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor - GDNF) (LAU et al., 2011); fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain Derived Neurotrophic Factor-BDNF) (YAU et al., 2014) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (TREJO, et al., 2010). Fang et al., (2013), mostraram que o exercício físico à velocidade de 15 m/min, 30 min/dia, por 5 dias, atenuou a redução na expressão de BDNF induzida pelo estresse no hipocampo de ratos. Isto é de particular importância durante o desenvolvimento, por ser o BDNF um importante regulador da plasticidade sináptica no cérebro (ROTHMAN et al., 2013).

Fatores tróficos estão implicados na sobrevivência e diferenciação celular, em alterações nas conexões sinápticas, memória e resistência aumentada ao estresse oxidativo (LEEDS et al., 2005; KLUMPP et al., 2006). As ações do BDNF não estão limitadas apenas ao SNC, mas esse fator também influencia processos relacionados à regulação do metabolismo e homeostase (KNAEPEN et al., 2010; ZHU et al., 2013). Foi demonstrado que ratos neonatos tratados subcutaneamente com MSG, apresentam baixa regulação de BDNF no tecido hipotalâmico e adiposo, que por sua vez pode estar envolvido na obesidade de origem hipotalâmica induzida pelo MSG (JIN et al. 2015). Outro mecanismo neuroprotetor, conseqüente ao exercício, envolve a modulação do estado oxidativo (CECHETTI et al., 2012). É sugerido que o exercício pode proteger contra o aumento da excitabilidade neuronal e dano oxidativo induzido pelo agente convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) (SOUZA et al., 2009). Este mecanismo leva-nos a considerar que o exercício pode proteger, ou pelo menos atenuar, o dano cerebral causado por estresse oxidativo gerado pela excitotoxicidade do MSG (GUDIÑO-CABRERA et al., 2014).

Em virtude do que foi apresentado acima, decidimos investigar, em ratos em desenvolvimento, se o MSG administrado por diferentes vias (oro-gástrica e tópica) persiste modificando a excitabilidade cortical como demonstrado previamente através da administração subcutânea (LIMA, et al., 1013). Adicionalmente, verificamos o impacto do exercício físico sobre o efeito do MSG administrado sistemicamente, por meio do fenômeno eletrofisiológico conhecido como “depressão alastrante cortical”, que é apresentado a seguir.

2.3 Depressão Alastrante Cortical

A “Depressão Alastrante da Atividade Elétrica Cerebral” ou simplesmente “Depressão Alastrante Cortical” (DAC), é um fenômeno que foi descrito originalmente por um cientista brasileiro, o doutor Aristides Azevedo Pacheco Leão. O fenômeno consiste em uma redução (“depressão”) da atividade elétrica cerebral em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto da superfície cerebral (LEÃO, 1944). Essa resposta é acompanhada do aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno, (LEÃO, 1947; 1951). Tanto a redução da atividade elétrica, quanto a VLV, características da DAC, se propagam (alastram) de forma concêntrica, a partir do ponto estimulado. Como regra geral, a recuperação completa do tecido cortical é obtida após cerca de 10 a 15 minutos (GUEDES, 2011). A figura 2 ilustra o fenômeno.

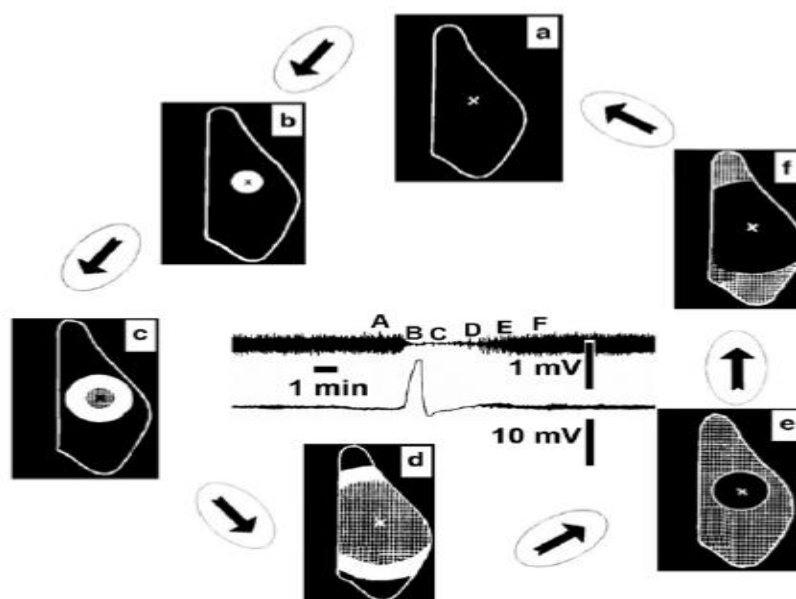


Figura 2. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC; adaptado de Guedes, 2011). Em “a”, um córtex normal e nele o ponto estimulado (x), iniciando a DAC. Na sequência indicada pelas setas, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada nos momentos “b” a “d”. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, (nos momentos “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, retorna-se à situação inicial (em “a”), em que todo o tecido se mostra completamente recuperado. No centro da figura, os dois traçados de registro demonstram o eletrocorticograma (ECoG; traçado superior) e a variação lenta de voltagem (traçado inferior), variação esta que sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F”, no EcoG, correspondem a sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

A VLV, que é a “marca registrada” da DAC, possui uma “forma de onda” bem definida, com início e fim fáceis de identificar; por isso, é muito utilizada para se calcular a velocidade com que o fenômeno se propaga pelo tecido nervoso. Essas características clássicas têm sido tradicionalmente analisadas por técnicas óticas e eletrofisiológicas (EIKERMANN-HAERTER e MOSKOWITZ, 2008), bem como por ressonância magnética funcional (AUTIO et al., 2014) as quais têm revelado, além do padrão concêntrico e circular desta atividade, uma taxa de propagação notavelmente lenta (alguns mm/min) em comparação com a ordem de grandeza da propagação dos impulsos nervosos em axônios (até dezenas de m/s).

Alguns autores postulam um mecanismo humoral para a propagação do fenômeno. Esse mecanismo seria baseado na liberação de um ou mais fatores químicos pelas células neurais, no momento em que elas fossem submetidas à DAC. Assim, à medida que esses compostos se difundissem através do espaço extracelular, como consequência da DAC, eles “contaminariam” as células vizinhas, deflagrando então, nelas, o fenômeno. Estas células uma vez “deprimidas” eletricamente, também passariam a liberar estes mesmos fatores que contaminariam outras células, e assim por diante, dando lugar a uma propagação automantida e sustentada (LEHMENKUEHLER et al., 1993). Além disso, durante a DAC várias outras modificações ocorrem no tecido neural, como dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944b); mudanças dramáticas em gradientes iônicos e fluxo sanguíneo (GORJI, 2001; SMITH et al., 2006); alterações extracelulares das concentrações de certos aminoácidos como taurina e glutamato (SCHELLER et al., 2000; ZHOU et al., 2013). Todas essas modificações são reversíveis.

Inicialmente os estudos sobre o fenômeno da DAC se concentravam em modelos animais (BURES et al., 1974), mas recentemente tem sido investigada em seres humanos em diversos contextos clínicos (KRAMER et al., 2015), tais como: enxaqueca com aura (FERRARI et al., 2015), a epilepsia (FABRICIUS et al., 2008; WEI et al., 2014), isquemia cerebral (DREIER et al., 2011) e esclerose múltipla (PUSIC et al., 2015). Estudos desenvolvidos no “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde teodósio” (LAFINNT), do departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), têm comprovado que a susceptibilidade cortical ao fenômeno da DAC pode ser influenciada pelas condições em que se encontra o tecido cerebral. Condições farmacológicas, hormonais, nutricionais e comportamentais podem tornar o córtex mais vulnerável ou mais resistente à propagação da DAC, expressando velocidades de propagação respectivamente mais altas ou mais baixas (GUEDES, 2011).

Assim, o fenômeno pode ser de grande utilidade como um modelo experimental. As tabelas 1 e 2 listam algumas das condições que, respectivamente, facilitam e dificultam a propagação da DAC.

Tabela 1. Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Redução do cloreto extracelular	GUEDES e DO CARMO, 1980
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ E 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
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS 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 (via subcutânea)	LIMA et al., 2013
Tratamento com 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
Envelhecimento	GUEDES et al., 1996
Hiperglicemia	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991 COSTA-CRUZ et al., 2006;
Estimulação ambiental multi-sensorial	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
Abolição da função ovariana (castração) no início da vida	ACCIOLY et al., 2012
Tratamento como antagonista opióide Naloxone	GUEDES et al., 2013
Exercício físico em esteira	LIMA et al., 2014; MONTEIRO et al., 2015

À semelhança do MSG, o exercício físico também pode causar uma série de efeitos metabólicos e também à nível de sistema nervoso em animais (ANDREAZZI et al., 2009; BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). Ambas as condições, MSG e exercício, tem o córtex cerebral como uma importante área-alvo para suas ações, as quais parecem ser de natureza opostas. Evidências apontam o exercício físico como tendo grande influência neuroprotetora, ligada à melhora no desempenho cognitivo, excitação e bem-estar geral (MIRANDA et al., 2013). Em contrapartida, evidências sugerem efeitos neurotóxicos do MSG sobre o sistema nervoso central (MUSA e SUNDAY, 2013; GUDIÑO-CABRERA et al., 2014).

Portanto, em virtude do que foi exposto acima, o presente trabalho se propôs a investigar, os possíveis efeitos neurotóxicos do MSG por duas diferentes vias de administração (sistêmica e tópica), juntamente com os possíveis efeitos benéficos do exercício físico, do ponto de vista eletrofisiológico, por meio do fenômeno da DAC, como demonstrado previamente, com a aplicação do MSG por via subcutânea (LIMA et al., 2013; 2014).

3. HIPÓTESE

- Os tratamentos sistêmico e tópico com MSG facilitam a propagação da DAC à semelhança do que ocorre com a sua administração por via subcutânea. O efeito facilitador do MSG administrado sistemicamente é antagonizado em animais exercitados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar, no rato Wistar em desenvolvimento, o efeito da administração de MSG, por via oro-gástrica (gavagem), associada ou não ao exercício físico, bem como analisar o efeito da aplicação tópica cortical do MSG sobre o modelo eletrofisiológico da DAC.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar as variáveis da “depressão alastrante cortical” (velocidade de propagação, amplitude e duração), como indicador de efeitos eletrofisiológicos cerebrais;
- Investigar a interação MSG/exercício físico e a via de administração oro-gástrica/tópica sobre a suscetibilidade cortical ao fenômeno da DAC;
- Comparar os resultados acima com aqueles previamente obtidos em ratos tratados com MSG por via subcutânea.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados 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 no uso de animais experimentais da UFPE (Processo nº 23076.016858/2014-11 – ANEXO A). As normas adotadas são as 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 suficientes para garantir o consumo *ad libitum*. Os animais, durante todo o estudo, foram alojados em gaiolas de polietileno (51 cm × 35,5 cm × 18,5 cm) e mantidos em sala com temperatura de 23 ± 1 °C, num ciclo claro-escuro de doze horas (o período “claro” sempre iniciado às 06:00 h).

As ninhadas de onde vieram os filhotes deste estudo foram constituídas por 9 ± 1 ratos neonatos de ambos os sexos (mas com predominância de machos). Após o desmame, quando os animais estavam com vinte e um dias de vida pós natal (P21), todos recebiam a dieta padrão materna (“Presence”; Purina do Brasil Ltda.).

5.2 Delineamento experimental

Os animais acima citados foram reunidos e distribuídos aleatoriamente para constituir os grupos experimentais que foram tratados sistemicamente (por gavagem), os quais posteriormente foram submetidos ao protocolo de exercício físico e registro eletrofisiológico, conforme descrito e ilustrado na Figura 3. Adicionalmente, animais ingênuos, que não

receberam tratamento sistêmico, nem realizaram exercício físico, constituíram os grupos experimentais submetidos à aplicação tópica cortical de MSG em diferentes concentrações (ver item 5.7).

Abaixo está demonstrada a divisão dos grupos experimentais que receberam tratamento sistêmico com MSG em duas doses diferentes, os quais posteriormente foram submetidos ou não ao exercício físico.

Grupo 1- (MSG-2): recebeu MSG na dose de 2g/Kg de peso corporal via orogástrica, diariamente, do sétimo até o vigésimo sétimo dia de vida pós-natal (P7 - P27).

Grupo 2- (MSG-2 - EXERC.): recebeu o MSG 2g/Kg peso corporal, como o grupo 1 acima, e foi submetido ao exercício em esteira, do vigésimo oitavo – trigésimo terceiro dia até o quadragésimo sexto- quinquagésimo primeiro dia de vida pós-natal (P28-P33 a P46-P51).

Grupo 3- (MSG-1): receberam dose de MSG (1g/Kg peso corporal) via orogástrica, diariamente, do sétimo até o vigésimo sétimo dia de vida pós-natal (P7 - P27).

Grupo 4- (MSG-1- EXERC.): receberam 1g/Kg de MSG, como o grupo 3, e foram submetidos ao exercício em esteira, nas mesmas condições do grupo 2.

Grupo 5- (CONTROLE): receberam gavagem com água (veículo) no mesmo volume dos grupos experimentais, também durante o mesmo período neonatal.

Grupo 6- (CONTROLE - EXERC.): receberam água e foram submetidos ao exercício em esteira, nas mesmas condições do grupo 2.

A figura 3 (abaixo) ilustra a formação desses grupos experimentais.

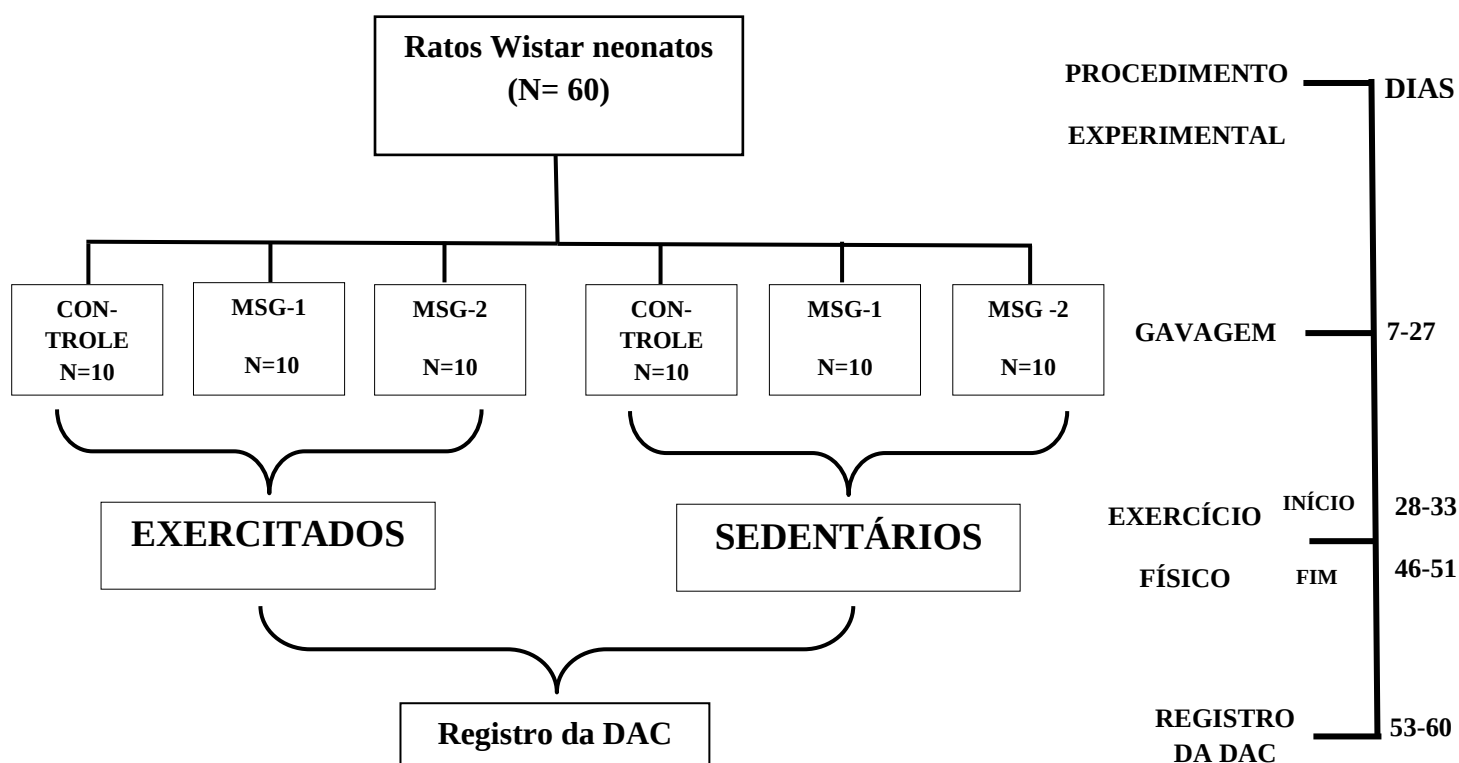


Figura 3. Representação esquemática dos grupos tratados sistemicamente no início da vida com MSG, submetidos ou não ao protocolo de exercício físico em esteira.

5.3 Determinações de Peso corporal

Os pesos corporais foram aferidos com auxílio de uma balança eletrônica Filizola modelo MF-3/1 (capacidade de 3,0 Kg e escala em divisão de 0,5g), aos **7, 17, 27 e 48** dias de vida.

5.4 Tratamento sistêmico com glutamato monossódico

O tratamento com MSG (Sigma, St. Louis, USA) foi realizado do 7º ao 27º dia de vida pós-natal, sempre no mesmo horário, entre 11 e 13 horas. O MSG, nas doses de 2g/Kg e 1g/Kg de peso corporal/dia), foi administrado diretamente no estômago pela técnica de gavagem. Esta via tem a vantagem de permitir a administração da dosagem exata pré-estabelecida. Uma cânula de polietileno (utilizada na segunda e terceira semanas de vida) ou

ação (utilizada na quarta semana de vida) com esfera na extremidade foi cuidadosamente introduzida na cavidade oral do animal, passando pelo esôfago e chegando até o estômago, onde a solução com MSG era depositada (MENDES-DA-SILVA et al., 2014). A dose de MSG foi estabelecida de acordo com os níveis de toxicidade relatada por outros autores (DATTA et al., 2013; LIMA et al., 2013). O volume inicial administrado por gavagem foi 0,5 ml na segunda e terceira semanas de vida; e 1 ml na quarta semana de vida, como previamente descrito (LIMA et al. 2009).

5.5 Descrição do exercício físico em esteira

O protocolo de exercício em esteira seguiu os parâmetros de exercício moderado, como anteriormente descrito (GOMES DA SILVA et al., 2010; LIMA et al., 2014; MONTEIRO et al., 2015). O exercício consistiu de corrida em esteira motorizada (marca Insight, modelo EP-131, 0° de inclinação). Ele foi iniciado na segunda-feira subsequente ao término do tratamento com MSG (quando os animais tinham entre $P30 \pm 3$ dias de vida) e se estendeu por três períodos de cinco dias (de segunda a sexta-feira), intercalados por dois dias de descanso (sábado e domingo), de tal modo que, ao término do período de exercício (19 dias corridos) os animais estavam com idades entre 48 ± 3 dias. A velocidade da corrida aumentava gradualmente, passando de 5 m/min, no primeiro período de cinco dias, para 10 m/min no segundo período e 15 m/min no terceiro período. Os animais dos três grupos sedentários permaneceram na esteira pelo mesmo período (30 minutos), porém, com o equipamento desligado. Na Figura 4, abaixo, está a representação esquemática do protocolo de exercício físico.

Períodos de treino	1º período	2º período	3º período
Duração de cada sessão diária	30 min	30 min	30 min
Número de sessões de treino por período	5	5	5
Velocidade da corrida	5m/min	10m/min	15m/min
Distância percorrida em cada sessão diária	150m	300m	450m

Figura 4. Representação esquemática do protocolo de exercício físico

5.6 Registro da Depressão Alastrante Cortical (DAC)

Quando atingiram a idade entre 55 ± 5 dias, os animais foram anestesiados com uma solução de uretana a 10% e cloralose a 0,4%, na dose de 10 ml/Kg de peso corporal (1g/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose) via intra-peritoneal. Foram trepanados três orifícios no lado direito do crânio, sendo um frontal (2-3 mm de diâmetro) para aplicação do estímulo que deflagrou a DAC, e dois parietais (3-4 mm de diâmetro) para colocação dos dois eletrodos registradores. Os orifícios foram alinhados paralelamente à linha média.

O registro foi feito nos dois pontos parietais do hemisfério cerebral direito, por um período contínuo de 4 horas, em um sistema digitalizador (EMG Systems) que permitiu visualizar e armazenar os dados em computador. O fenômeno foi deflagrado a cada 20 minutos por estimulação química na região frontal, sendo utilizado para isto uma bolinha de algodão (1-2 mm de diâmetro) embebida em solução de cloreto de potássio (KCl) a 2% (2 g de KCl dissolvidos em 100 ml de água destilada; aproximadamente 270 mM), aplicada durante 1 minuto sobre a dura-mater intacta. Durante o registro, a temperatura retal do animal foi mantida estável ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por meio de um aquecedor elétrico. 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. Na figura abaixo se encontra o esquema do registro eletrofisiológico da DAC.

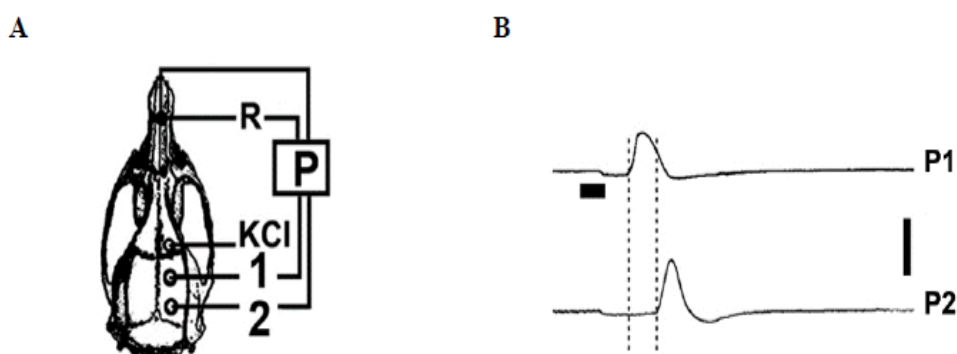


Figura 5. Esquema do registro eletrofisiológico da DAC. Em “A”, desenho do crânio de um rato com a identificação dos três orifícios necessários ao experimento. O orifício “KCl” corresponde ao local de estimulação (na região frontal); os pontos “1” e “2” correspondem aos dois pontos de registro da DAC na 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 (VLV) da DAC, em que a barra horizontal representa o tempo de 1 minuto (referente à 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.

5.7 Tratamento tópico cortical com glutamato monossódico

O tratamento tópico com MSG foi realizado em ratos com idade entre 50-60 dias, os quais não foram submetidos a qualquer tratamento prévio. A aplicação tópica de MSG foi realizada durante o registro eletrofisiológico da DAC, seguindo o mesmo protocolo de registro mencionado acima (ver item anterior 5.6), mas com uma duração maior (6 horas ao invés de 4). MSG foi diluído em solução de Ringer à concentração de 25, 50 e 75 mg/ml. As soluções de MSG foram aplicadas topicamente nos três grupos de ratos machos jovens ($n = 8$, para cada grupo). Essa aplicação tópica foi realizada sobre a dura-mater intacta, em dois orifícios circulares (3–4 mm diâmetros) da superfície cortical, onde os eletrodos registradores estavam posicionados.

Após 80 min de registro basal (no qual foram gerados quatro episódios de DAC), aplicou-se o MSG topicamente sobre o ponto de registro 1 durante os últimos 10 min dos 20 min de intervalo entre duas estimulações com KCl para eliciação da DAC. Ao final da aplicação tópica, a região tratada era secada com algodão imediatamente antes do próximo episódio da DAC ser deflagrada. Nós realizamos três consecutivas aplicações tópicas de MSG. Após a Terceira aplicação com MSG, a região cortical tratada era abundantemente lavada com solução de Ringer e o registro da DAC prosseguia durante os 80 min do período de recuperação. Em continuação, três aplicações tópicas foram realizadas sobre o ponto de registro 2 por 1 hora, seguida por um período de recuperação (durante a qual, mais quatro episódios de DAC foram deflagradas). Em cada animal, nós comparamos as velocidades de propagação da DAC antes e após as aplicações tópica de MSG. Um diagrama temporal mostrando o período inicial basal, os dois períodos de aplicação tópica com MSG e os dois períodos de recuperação estão apresentados na figura 6.

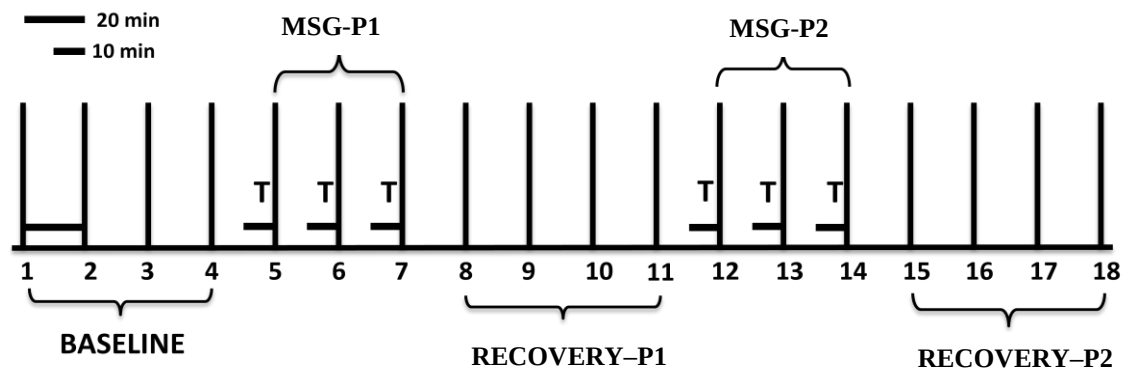


Figura 6. Diagrama do protocolo para aplicação tópica cortical do MSG durante a sessão de registro da DAC. Após um período de registro basal (baseline), MSG foi aplicado três vezes sobre o ponto de registro 1 (MSG-P1), por um período de 10 min (representado pela barra horizontal mais curta) e isso foi seguido por um período de recuperação (RECOVERY-P1). As linhas escuras verticais equidistantes indicam estimulação com KCl a intervalos de 20-min (representado pela barra horizontal mais comprida), necessário para deflagrar a DAC. O mesmo protocolo se estende ao ponto de registro 2, com três aplicações tópicas de MSG (MSG-P2) seguido por um período de recuperação (RECOVERY-P2).

5.8 Eutanásia

Ao final da sessão de registro, estando o animal ainda anestesiado, foi provocada lesão dos centros de controle cardiorrespiratórios, pela introdução de uma agulha na região bulbar, através da cisterna magna. Esse procedimento levava a imediata parada da respiração, seguida por parada cardíaca.

5.9 Análise estatística

As diferenças intergrupos foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Holm-Sidak. Para isto, foi utilizado o programa “Sigmastat”, versão 3.1. Foram consideradas significantes as diferenças em que $P \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO - ARTIGO ORIGINAL

Title: Opposite effects of oral *versus* topical treatment with monosodium glutamate on cortical spreading depression in exercised and sedentary rats



(Submetido- ANEXO B)

Authors: Suênia Marcelle **Vitor-de-Lima**, Larissa Medeiros de **Brito**, Regina de Deus Lira **Benevides**, Catarina Nicácio dos **Santos**, Nahara Oliveira Lima da **Silva** and Rubem Carlos Araújo **Guedes**^{CA}

Affiliation: Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife PE, Brazil. Telephone: +55-81-21268936, FAX: +55-81-21268473

^{CA}=**Corresponding Author**; address: Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife PE, Brazil. Telephone: +55-81-21268936, FAX: +55-81-21268473. E-mails: 1) rguedes@ufpe.br 2) guedes.rca@gmail.com

Abstract

Aims: We previously demonstrated that subcutaneous treatment with monosodium glutamate (MSG) accelerated cortical spreading depression (CSD) in the rat cerebral cortex, and treadmill exercise attenuated this effect. This study evaluated whether other administration routes exert the same action, by testing orogastric (gavage) and topical cortical MSG administration.

Main methods: We administered per gavage water (control group), or MSG (1 g/kg or 2 g/kg) daily from postnatal (P) day 7 to 27. Treadmill exercise started at P28–33 and lasted 3 weeks, 5 days/week, 30 min/day. At P53–60, we recorded CSD for 4 h at two cortical points and calculated the CSD parameters (velocity, amplitude, and duration of the negative potential change). In another three groups of rats, we applied MSG solutions (25 mg/ml, 50 mg/ml and 75 mg/ml) topically on the intact dura mater, during CSD recording.

Key findings: MSG per gavage increased CSD velocities in a dose-dependent manner compared with water-treated controls ($p < 0.05$). Treadmill exercise significantly diminished this CSD acceleration. In contrast to gavage, topical MSG impaired CSD propagation, reduced CSD amplitude and increased its duration in a reversible and dose-dependent manner ($p < 0.05$).

Significance: The results demonstrate that orogastric MSG early in life accelerates, while cortical topical MSG impaired, CSD propagation, suggesting two distinct mechanisms. The exercise-dependent attenuation of the MSG effects confirms our previous results on rats treated subcutaneously with MSG, and suggests interaction between both factors. Data also suggest that exercise can help in preserving the neurological health of both developing and adult human brain.

Keywords: Monosodium Glutamate. Physical exercise. Brain electrophysiology. Cortical spreading depression.

1. Introduction

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). It stimulates glutamate receptors and plays important role in both physiological and pathological processes [1,2]. The sodium salt of glutamate, monosodium glutamate (MSG) has been used as a flavor enhancer in human diets [3]. When repeatedly administered to developing rats, MSG is capable of producing a wide range of pathological processes [4,5] causing excitotoxicity in the brain cells [6].

The route of administration is an important factor in determining the action of some drugs. Regarding MSG, the scarce studies comparing different routes of administration are controversial, with studies on the intraperitoneal and oral routes reporting either similar effects [7], or different effects [8]. Distinct actions of other compounds, as a function of the route of administration, have also been reported [9]. However, the majority of the studies are conducted using either route alone, and with some differences in dosage and duration, resulting in several metabolic [10], behavioral [11], hormonal [12] and electrophysiological [13] abnormalities.

Regarding the MSG electrophysiological effects, we previously treated developing rats with MSG by subcutaneous route, and demonstrated a facilitating action on the propagation of the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) [14]. CSD has been described as a slowly propagating wave of reduction of spontaneous cortical electrical activity that spreads concentrically and reversibly in response to chemical, electrical, or mechanical stimulation of one point of cortical tissue [15]. The brain's ability to propagate CSD can be enhanced, or impaired, through experimental manipulation under which the excitability of cortical tissue changes [16]. Therefore, measuring the velocity of CSD propagation may help elucidate brain functioning in health and disease [17,18]. A growing body of evidence indicates that physical exercise can help in maintaining brain health

and cognitive function under normal or adverse conditions [19,20]. However little information is available regarding electrophysiological effects of physical exercise performed at earlier stages of life, combined or not with MSG treatment. Previously, we started to investigate this combination by treating sedentary and exercised rats with subcutaneous MSG [21]. In the present study, we tested the CSD effects of MSG administered by orogastric (gavage) and topical (cortical application) routes, in association with treadmill exercise.

2 Materials and methods

2.1 Animals

All experimental procedures were previously approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Research of our University (Approval protocol no. 23076.016858/2014-11), 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 in litters with nine pups. 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 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12-h light:12-h dark cycle (lights on at 6:00 AM). Body weight was measured on postnatal days 7, 17, 27 and 48.

2.2 MSG systemic treatment early in life

From postnatal days 7 to 27, Male Wistar rat pups received per gavage 1 g/kg MSG, or 2 g/kg MSG (purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA; n=20 for each group). These experimental groups were compared to one control group that received just water (group water; n = 20). The dose of MSG was established according to the dose reported by other authors [22,14]. 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 [23].

2.3 Treadmill exercise

Following the gavage treatment, from postnatal day 30 ± 3 ten animals from each group (n=30) were subjected to daily sessions of running in a treadmill (Insight EP-131, 0° inclination; 30 min/d, 5 d/week, total time: 3 weeks). The treadmill exercise followed the moderate exercise parameters as previously described [24; 21]. The exercised rats were compared to the remaining thirty rats (10 rats per group) that did not experienced the treadmill exercise (sedentary controls), which were placed daily during an equivalent period in the treadmill apparatus that remained off.

2.4 CSD recording

When the animals were 50 ± 5 days old, they were submitted to CSD recording during 4 hours, as previously described [25]. Under anesthesia, (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose injected intraperitoneally), the rat's head was secured in a stereotaxic apparatus

(Kopf, USA), and three trephine holes (2–3 mm in diameter) were drilled on the right side of the skull: two holes were at the parietal bone and one at the frontal bone; they were aligned in the anteroposterior direction and were also parallel to the midline. CSD was elicited at 20-min intervals by a 1-min application of a cotton ball (1–2 mm in diameter) soaked with KCl solution (2 g KCl in 100 ml 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 on two points of the parietal surface (here named recording points 1 and 2) 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. These electrodes consisted of plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter), filled with Ringer solution solidified by adding 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. Pairs of such pipettes were fixed together with cyanoacrylate glue, so that the interelectrode distance was kept constant for each pair (range: 4 – 6.5 mm). The pair of electrodes was fixed to the electrode holder of the stereotaxic apparatus, so that the electrodes could be gently placed on the intact dura-mater without any excessive pressure on the cortical surface. 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 the amplitude and duration of the CSD waves, as previously reported [26]. At the end of the session, while still anesthetized, the animal was killed by introducing a needle in the bulbar region through the *cisterna magna*. This procedure led to immediate cessation of breathing, followed by cardiac arrest.

2.5 Cortical topical MSG treatment

The acute topical treatment with MSG was performed in male rats aged 50-60, which were not subjected to any previous treatment. Topical MSG application was performed during electrophysiological recording of DAC, following the same registration protocol mentioned above (see section 5.5), but with a longer duration (6 hours instead of 4).

MSG (Sigma, St. Louis, USA) was diluted in Ringer solution at the concentrations of 25, 50 and 75mg/ml, which were topically applied in three groups of male young rats ($n = 8$, for each group). This topical application was performed over the intact dura-mater, on two circular portions (3–4 mm diameter) of the cortical surface, where the recording electrodes were placed. After an 80 min baseline CSD recording (in which we triggered four episodes of CSD), MSG was applied topically on the recording point 1 during the last 10 min of the 20 min interval between two consecutive CSD-eliciting KCl stimulations. At the end of the topical application, the treated region was dried out with a piece of cotton immediately before the next CSD episode was elicited. We performed three consecutive topical applications of MSG. After the third MSG application, the treated cortical region was abundantly washed out with Ringer solution and the CSD recording continued during the 80 min of the recovery period, during which four CSD episodes were recorded. In continuation, three topical applications of MSG were made on the recording point 2 over 1 hour, followed by a recovery period (during which four more episodes of CSD were elicited). In each animal, we compared the CSD propagation velocities before and after topical application of MSG. A time diagram of the recording session showing the initial baseline period, the two MSG application periods and the two recovery periods is presented in figure 1.

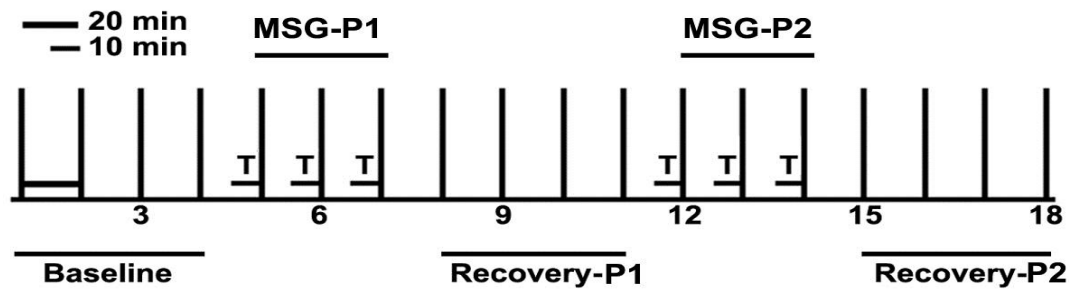


Fig.(1) Diagram of the protocol for MSG topical (T) cortical application during the CSD recording session. After a control (baseline) recording period, MSG was applied three times on the recording point 1 (MSG-P1), for a period of 10 min (represented by the shorter horizontal bars) and this was followed by a recovery period (RECOVERY-P1). The equidistant vertical dark lines indicate KCl stimulation at 20-min intervals (represented by the longer horizontal bars), necessary to elicit CSD. The same protocol extends to the recording point 2, with three topical applications of MSG (MSG-P2) followed by a recovery period (RECOVERY-P2).

2.6 Statistics

In the systemic MSG experiments, intergroup differences were compared by ANOVA followed by a post hoc (Holm–Sidak) test when indicated. In the topical MSG application experiments, comparison in the same animal for the CSD velocity before and after MSG was performed with the paired t-test. The statistical software used was “Sigmastat®” version 3.10. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Body weight

As illustrated in Figure 2, no significant difference was found between sedentary and exercised pups, or when we compare the three treatments (water, MSG-1 and MSG-2).

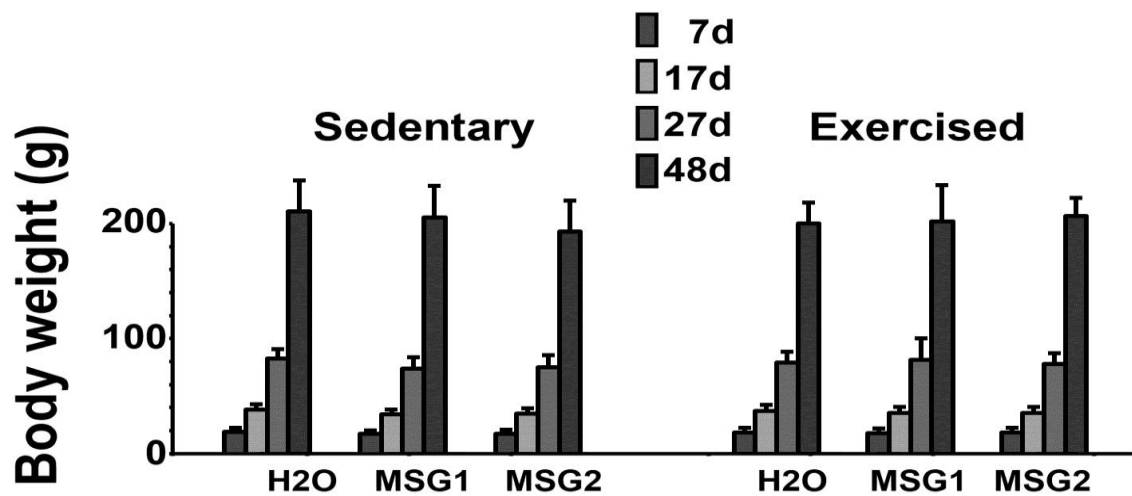


Fig. 2. Mean $\pm$ standard deviation values of body weight at 7, 17, 27 and 48 postnatal days. A progressive body weight gain independent of treatment was observed in all time windows. Physical exercise did not significantly affect the evolution of body weight in pups subjected to either experimental condition.

3.2. Systemic MSG and CSD parameters

Figure 3 presents examples of electrophysiological recordings documenting KCl-elicited CSD in the water-, MSG1- and MSG2-groups of young rats in the exercised and sedentary condition. The topical application of KCl for 1 min in one point of the frontal cortex in the right hemisphere usually elicited a single CSD episode that propagated and was sequentially recorded by the two epidural electrodes gently placed over the parietal region of the same hemisphere (see the recording points 1 and 2 in the skull diagram). In each recording point, the slow potential change confirmed the presence of CSD after KCl application. As a

rule, recovery of the electrophysiological changes caused by CSD took approximately 5 to 10 min, and we maintained a 20-min interval between subsequent stimulations with KCl.

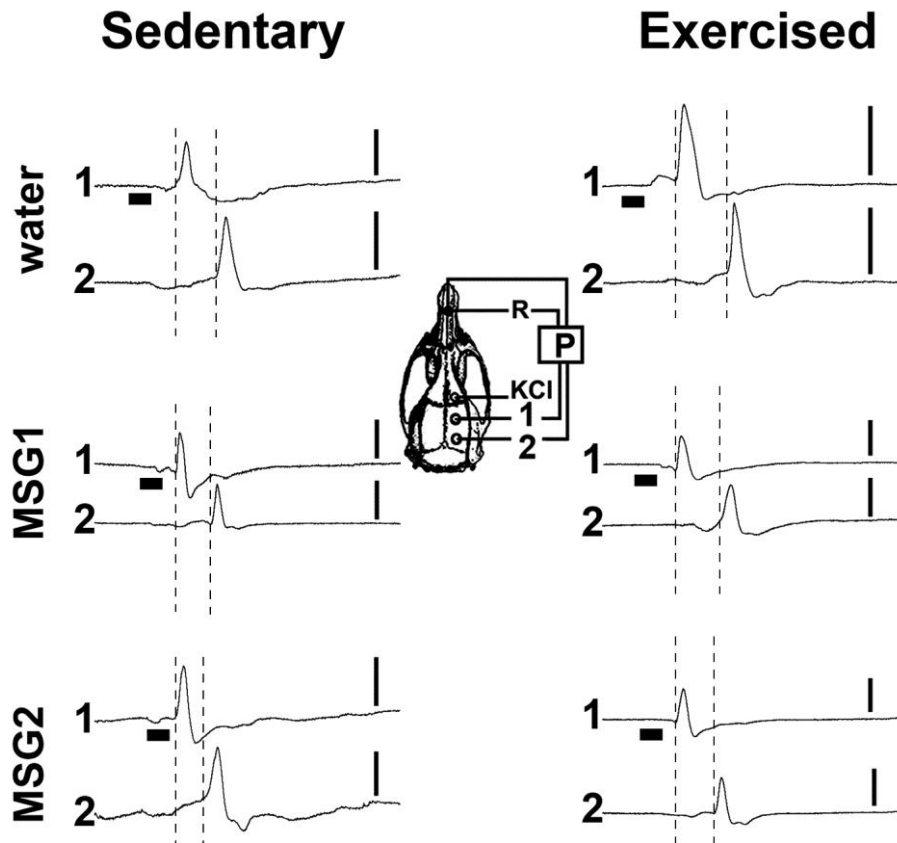


Fig. 3. Recordings of the slow potential changes (P) during cortical spreading depression (CSD) at two cortical points (1 and 2) in 6 young rats (3 exercised and 3 sedentary). The diagram of the skull shows the recording positions 1 and 2 from which the traces marked at the left with the same numbers 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. Water, MSG1 and MSG2 are rats treated per gavage with water, 1 g/kg and 2 g/kg monosodium glutamate 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 longer in the exercised groups compared with the corresponding sedentary groups. In relation to the treatment, the latencies were shorter in the groups treated with MSG when compared with the respective control (water).

ANOVA indicated intergroup difference between exercised and sedentary animals, regarding CSD velocity of propagation, and *post hoc* (Holm–Sidak) test comparisons showed that the velocities were lower ($p < 0.05$) in the exercised groups compared to the sedentary groups (in figure 4 this is represented by the symbol #). In the sedentary groups, ANOVA detected a main effect of treatment, and *post hoc* testing revealed that treatment with MSG early in life dose-dependently resulted in higher CSD velocities compared with the water-treated controls (mean $\pm$ standard deviation in mm/min: 3.55 ± 0.07 , 4.11 ± 0.12 , and 4.52 ± 0.21 , respectively for the water, MSG1 and MSG2 sedentary groups; $p < 0.05$).

In all groups, exercise decelerated the CSD propagation. In the exercised groups the CSD velocity was significantly lower than the corresponding sedentary groups (3.24 ± 0.07 , 3.72 ± 0.05 and 4.10 ± 0.06 , respectively for the water controls, MSG1 and MSG2). Fig.4 shows the data on CSD velocity.

The amplitude and duration of the negative slow potential shift, which is the hallmark of CSD, are presented in Table 1. The mean amplitude in the sedentary groups varied from 8.5 ± 0.9 mV to 16.1 ± 4.9 mV, in the exercised groups amplitude varied from 8.1 ± 1.0 to 12.1 ± 3.3 mV. The mean duration in the sedentary groups ranged from 68.3 ± 2.7 s to 60.7 ± 2.5 s; in the exercised groups, it varied from 69.0 ± 1.7 s to 63.2 ± 2.6 s. Regarding the amplitude, ANOVA indicated intergroup difference between exercised and sedentary animals, and *post hoc* (Holm–Sidak) test comparisons showed that the amplitudes were lower ($p < 0.05$) in the exercised MSG2 groups compared to the sedentary MSG2 groups (Table 1 this is represented by *). In relation the durations, ANOVA indicated intergroup difference between exercised and sedentary animals, and *post hoc* testing revealed that there was significant increase in the exercised MSG2 groups compared to the sedentary MSG2 groups (Table 1 this is represented by **).

Table1. Amplitude and duration of the negative slow potential shifts of cortical spreading depression in sedentary and exercised rats treated with water (control group), and monosodium glutamate (MSG). MSG- 1, 1 g/kg; MSG-2, 2 g/kg. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. In each column, values with different letters are statistically different ($p < 0.05$). * = different from the corresponding sedentary value ($p < 0.05$).

SYSTEMIC TREATMENT EARLY LIFE	AMPLITUDE(mV)		DURATION(s)	
	SEDENTARY	EXERCISED	SEDENTARY	EXERCISED
WATER	8.5 ± 0.9^a	8.1 ± 1.0^a	68.3 ± 2.7^a	69.0 ± 1.7^a
MSG-1	10.2 ± 2.1^b	10.0 ± 2.3^{ab}	63.0 ± 1.9^a	64.3 ± 2.4^b
MSG-2	16.1 ± 4.9^c	$12.1 \pm 3.3^{b*}$	60.7 ± 2.5^b	$63.2 \pm 2.6^{b*}$

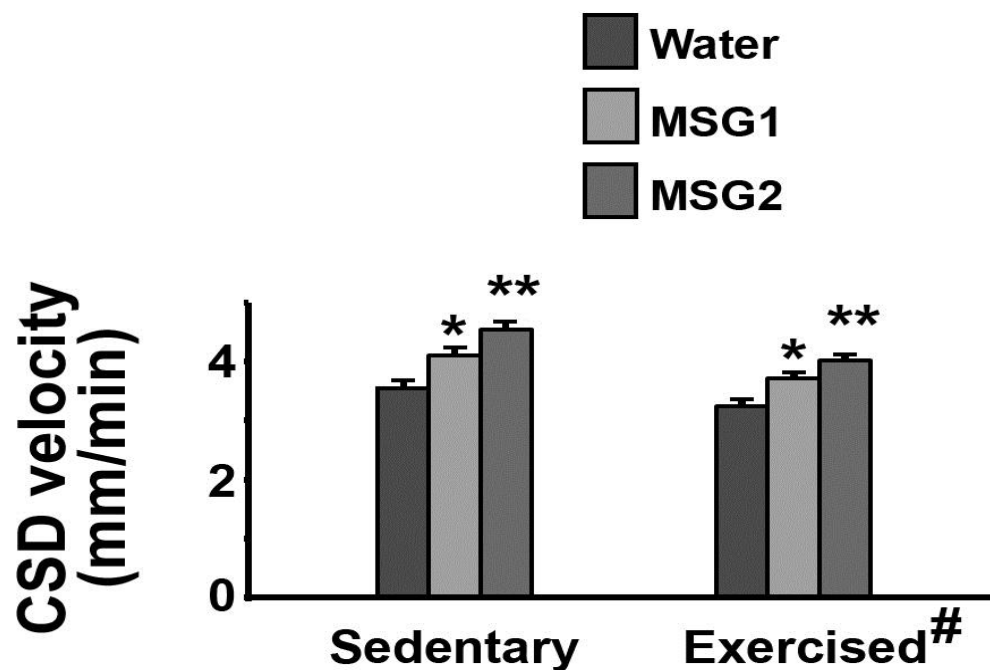


Fig. 4. CSD velocities of propagation in 53-60- day-old rats that had received, during the lactation period, water; 1 g/kg MSG or 2 g/kg MSG per gavage. Data are mean $\pm$ standard deviation. * = significantly different from the control groups; ** = significantly different from both the control and MSG1 groups ($p < 0.05$; ANOVA followed by the Holm-Sidak test). # indicates that all exercised groups were significantly different from the corresponding sedentary groups ($p < 0.05$).

3.3. Topical MSG and CSD parameters

To assess the effect of topical MSG on the CSD parameters, we applied MSG topically at different concentrations (25, 50 and 75 mg/ml) during 10 min over the intact dura-mater at the two recording sites. Our results showed that at 25 mg/ml topical MSG did not affect the CSD parameters (amplitude, duration and velocity of propagation), whereas 50 mg/ml and 75 mg/ml solutions were effective in significantly and reversibly reducing the amplitude (Table 2), increasing the wave duration (Table 3) and decelerating CSD (Figure 5).

Table 2 Amplitudes (in mV) of the negative DC slow potential shift of CSD in the rat cortex, elicited before, during and after (recovery period) topical cortical application of 25, 50 and 75mg/ml solutions of MSG on recording points 1 and 2. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.* = significantly different from both the basal and recovery values ($p < 0.05$; paired test t).

AMPLITUDE (mV)						
Recording Point 1	MSG solution (mg/ml)	Basal	MSG-1	Recovery-1	MSG-2	Recovery-2
	25	9.4 $\pm$ 3.1	7.7 $\pm$ 3.2	8.6 $\pm$ 3.1	9.0 $\pm$ 3.0	9.6 $\pm$ 3.1
	50	6.7 $\pm$ 2.0	2.6 $\pm$ 1.1*	5.0 $\pm$ 1.5	5.4 $\pm$ 2.8	5.8 $\pm$ 3.0
	75	7.2 $\pm$ 3.5	2.7 $\pm$ 2.0*	5.0 $\pm$ 2.0	5.9 $\pm$ 2.2	6.4 $\pm$ 2.3
Recording Point 2	25	5.6 $\pm$ 2.1	5.6 $\pm$ 2.0	6.3 $\pm$ 2.6	6.7 $\pm$ 5.0	7.6 $\pm$ 4.4
	50	8.3 $\pm$ 3.4	8.9 $\pm$ 5.5	8.1 $\pm$ 3.0	4.7 $\pm$ 2.3*	6.3 $\pm$ 2.9
	75	7.3 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 2.9	8.4 $\pm$ 2.9	1.0 $\pm$ 1.6*	2.4 $\pm$ 2.7

Table 3 Durations (in s) of the negative DC slow potential shift of CSD in the rat cortex, elicited before, during and after (recovery period) topical cortical application of 25, 50 and 75 mg/ml solutions of MSG on the recording points 1 and 2. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.* = significantly different from both the basal and recovery values ($p < 0.05$; paired test t).

DURATION (s)						
	MSG solution (mg/ml)	Basal	MSG-1	Recovery-1	MSG-2	Recovery-2
Recording Point 1	25	68.7 $\pm$ 1.7	68.8 $\pm$ 2.5	66.6 $\pm$ 3.8	67.0 $\pm$ 3.1	66.5 $\pm$ 1.6
	50	70.9 $\pm$ 3.2	73.7 $\pm$ 3.2*	70.3 $\pm$ 1.6	70.9 $\pm$ 1.8	70.6 $\pm$ 1.1
	75	68.1 $\pm$ 3.8	74.9 $\pm$ 5.0*	69.1 $\pm$ 2.9	68.2 $\pm$ 5.2	67.2 $\pm$ 2.9
Recording Point 2	25	68.8 $\pm$ 3.0	68.0 $\pm$ 3.6	69.2 $\pm$ 2.8	68.6 $\pm$ 3.1	68.1 $\pm$ 2.6
	50	70.2 $\pm$ 1.8	70.1 $\pm$ 1.7	69.2 $\pm$ 1.8	76.0 $\pm$ 6.8*	69.3 $\pm$ 2.4
	75	71.3 $\pm$ 2.6	72.0 $\pm$ 4.2	70.2 $\pm$ 3.1	76.4 $\pm$ 3.7*	69.4 $\pm$ 4.0

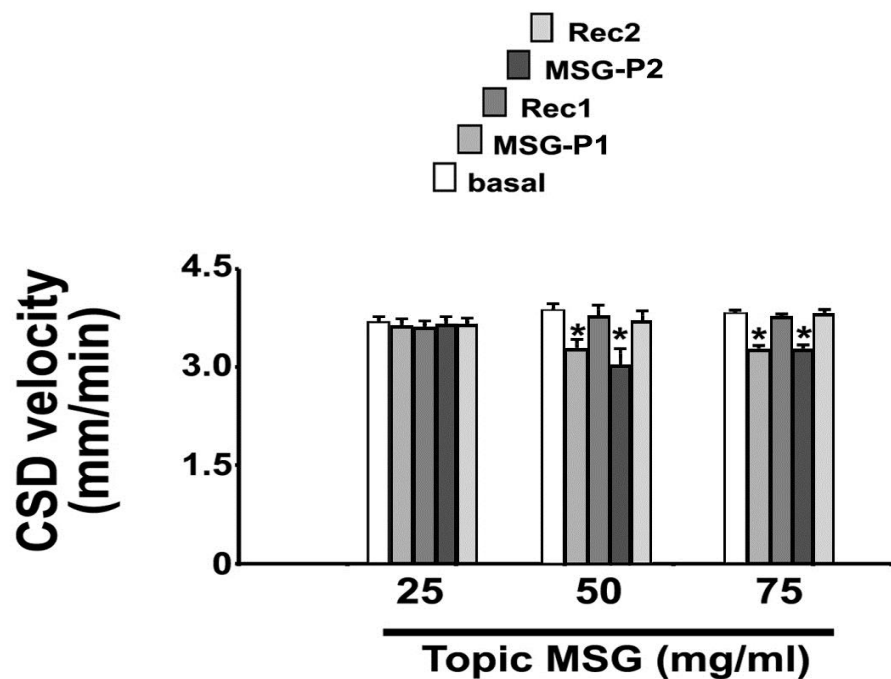


Fig.5. Reduction of CSD-velocity in male rats aged 50-60 days, after topical cortical application of MSG solution during the 10 min immediately preceding CSD elicitation with KCl. MSG was topically applied to a circular area (3–4 mm diameter) of the parietal cortical surface (recording places 1 and 2) on the intact dura-mater. MSG solutions were used with the following concentrations 25, 50 and 75 mg/ml. Basal: control CSD velocities before topical treatment. MSGP1/MSGP2: decrease of CSD velocities observed after topical application. Rec1/Rec2: recovery of CSD velocities after cortical removal of MSG. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation; * indicates significant difference compared to the basal or recovery condition. ($p < 0.05$; paired t-test)

4. Discussion

In the present study we were able to electrophysiologically identify in rats the neural activity changes produced in vivo by orogastric administration of MSG during the critical period of the nervous system development. Data clearly show that, in line with subcutaneous MSG injection [21], the orogastric administration of MSG facilitated CSD propagation, and this effect was more intense in the groups treated with the higher doses of MSG, suggesting a dose-response relationship. Furthermore, treadmill exercising diminished the effect of MSG on CSD propagation in the three early treated groups, indicating an interaction between the MSG treatment and exercising. The data support the hypothesis of an MSG-mediated facilitating process in CSD [14] and confirm previous studies on decelerating action of exercising on CSD [21,27]. Besides raising the question of how the intake of MSG might increase CSD susceptibility in the developing brain, our data sparks the discussion on what are the mechanisms that lead exercise to have opposite effect to the MSG. Another important finding of the present study was that topical cortical MSG application, in contrast with orogastric MSG administration, reduced CSD propagation in a reversible and dose-dependent manner. This deserves further comment (see below).

Systemic administration of MSG to neonatal animals can trigger not only short term, but also long term excitotoxic neuronal damage [28]. Although in this study we did not monitor the blood and brain levels of glutamate, based on evidence from the literature it is reasonable to suppose that the present long-term MSG treatment might have caused an increase in glutamate levels in plasma and brain [29,7]. It has been recently shown that subcutaneous MSG injection considerably increases brain extracellular glutamate levels and induces prolonged electroencephalographic activity and convulsions [13], a process that could influence phenomena such as seizures and CSD [30] and migraine [31]. In humans, ingestion of MSG (150 mg/kg body weight) significantly increases the levels of glutamate, and this has been associated with increased frequency of headache and nausea [32]. Glutamate levels are significantly elevated in patients with migraine and tension-type headache compared with healthy controls [33]. In this context, several pieces of evidence suggest that certain brain disorders, including migraine, are based on the abnormal function of different N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subtypes [34].

Regarding glutamatergic excitotoxicity, there are two broad mechanisms which converge and provide a final common pathway for cell vulnerability: excessive activation of glutamate receptors and oxidative stress [6]. Excessive activation of glutamate receptors leads to a number of deleterious consequences, including dysregulation of Ca^{+2} homeostasis, generation of free radicals and activation of mitochondrial permeability subsequent to secondary excitotoxicity [35]. In the present study, we hypothesized an increase in glutamate availability as a consequence of chronic administration of MSG, and this may play a key role in the brain susceptibility to CSD, as the ionotropic NMDA glutamatergic receptor is currently recognized as a key contributor to CSD induction and propagation [36,37]. The overactivation of NMDA receptors triggers excessive influx of Ca^{+2} , as well as Ca^{+2} release from intracellular compartments; calcium entry activates Ca^{2+} -dependent K^{+} channels,

releasing K⁺ into the extracellular space [38], thus contributing to a faster accumulation of extracellular K⁺. This is relevant for explaining our data on orogastric MSG treatment, as CSD propagation is mainly based on potassium-mediated mechanisms [39] and the increased calcium influx triggers and accelerates CSD in male adult rats [40]. Furthermore, the NMDA receptor antagonist MK-801 significantly reduced the frequency of SD in rats [38], and presynaptic glutamate reportedly participates in CSD [41]. Thus, this may be one of the mechanisms that may explain MSG-induced CSD facilitation.

Oxidative stress is well documented in MSG induced neurotoxicity. Farombi and Onyema [42] showed that the antioxidants vitamin C, vitamin E and quercetin have protective potential against oxidative stress induced by MSG and, in addition, suggested that active oxygen species may play an important role in its genotoxicity. High concentration of glutamate can reverse cystine/glutamate antiporter in astrocytes, and subsequently deplete cellular antioxidant glutathione (GSH) due to shortage of cystine [43]. Thus, excitotoxicity can originate not only from glutamate receptor overactivation but also from other gliotoxic actions of glutamate, which are mediated predominantly by a reduction in the GSH content. The glutamate toxic effects are almost completely blocked by anti-oxidants and glutamate transporter inhibitors [44,45]. Interestingly, CSD is more easily induced, and propagates faster in nervous tissue that is under high levels of oxidative stress [26]. Moreover, some authors have suggested that oxidative stress may be the primary cause of CSD and not just its consequence [46]. This suggestion is plausible considering that high levels of reactive oxygen species in the CNS can elicit CSD both in vitro [47] and in vivo [48]. In this context, our group has demonstrated the CSD facilitating effects of several experimental conditions that are associated with increased oxidative stress: chronic alcohol ingestion [49] malnutrition [50] and subcutaneous treatment with MSG [14], possibly associated with oxidative stress-induced ROS accumulation. However, at the moment we cannot discard other possible contributing

mechanisms, such as the MSG-induced reduction of the γ -aminobutyric acidergic activity [51] and enhancement of serotonin uptake [52,11].

A number of mechanisms have been proposed to mediate the effects of exercise on the brain, including increased hippocampal neurogenesis [53], increase of the capillary density (angiogenesis) [54], increase in cerebral blood volume [55] and cerebral blood flow [56]. Exercise-induced dendritic remodeling may also contribute to structural brain plasticity [57] through, for example, the pre- and postsynaptic proteins, such as synapsin I and synaptophysin [50,59]. The exact molecular mechanism by which treadmill exercise antagonized the effect of MSG on CSD remains unclear. However, as all the above-mentioned mechanisms also influence (to some extent) the production of CSD features in the brain [21], we are tempted to postulate that at least some of the above effects of exercise on several brain physiological processes are involved in the modulation of the CSD effects of MSG.

Another possible mechanism that could explain CSD-reduced velocities in exercised animals would be represented by enhancement of the serotonergic activity. It is documented that physical exercise can stimulate serotonergic neurotransmission by promoting the synthesis of serotonin from tryptophan, which becomes available for exercise-induced lipolysis [60,61]. Another study also confirmed that possibility, showing that voluntary wheel running for 4 weeks increased hippocampal levels of serotonin and the m-RNA of 5-HT receptors [62]. Recently, Monteiro et al. [63] showed that fluoxetine treatment in association with physical exercise on a treadmill exerts an antagonistic effect on the CSD. Indeed, several studies have demonstrated that increased brain serotonin availability exerts an antagonistic effect on CSD propagation [64].

One surprising finding of the present study was that, in contrast to the orogastric treatment (Fig. 4), topical application of MSG impaired CSD propagation. This effect was dose-dependent, and could be reverted by flushing the cortical area where MSG was applied

(Fig. 5). Data suggest the existence of two mechanisms, one involving the systemic action of MSG, that directly or indirectly act on the developing brain and accelerate CSD, and other, cortically-based mechanism, that would be responsible for the impairing CSD effect of topical application. An example of such topical effect of fluoxetine on CSD is given by Amâncio-dos-Santos et al., [64]. Further investigation will clarify those mechanisms.

5. Conclusion

In conclusion, we demonstrated that systemic (orogastric) MSG treatment early in life accelerates, while cortical topical MSG impaired, CSD propagation, suggesting two distinct underlying mechanisms. In the orogastric treated groups, treadmill exercise attenuated the MSG effects, which confirms our previous results on rats treated subcutaneously with MSG [1]. The electrophysiological data suggest interaction between MSG treatment and exercise, possibly reflecting the effects of both conditions on brain excitability. Clarifying the possibility that exercise can help in preserving the neurological health of both developing and adult human brain is a fascinating task that deserves investigation.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CAPES (AUXPE – CIMAR 1990/2014), CNPq (No. 445101/2014-8) and MCT/FINEP/CT-INFRA (PROINFRA – 01/2008) for financial support. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq(No. 303636/2014-9).

References

- [1] Y. Zhou, N.C. Danbolt, Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain, *J Neural Transm.* 121 (2014) 799-817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8
- [2] A. Lau, M. Tymianski, Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration, *Pflugers Arch.* 460 (2010) 525-42. doi: 10.1007/s00424-010-0809-1.
- [3] S. Jinap, P. Hajeb, Glutamate. Its applications in food and contribution to health, *Appetite.* 55 (2010) 1-10. doi:10.1016/j.appet.2010.05.002
- [4] J.W. Olney, Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, *Science.* 164 (1969), 719-721.
doi:10.1126/science.164.3880.719
- [5] B.D. Shivasharan, P. Nagakannan , B.S Thippeswamy, et al., Effect of *Calendula officinalis* L. Flowers Against Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress and Excitotoxic Brain Damage in Rats, *Ind J Clin.* 28 (2013) 292–298. doi: 10.1007/s12291-012-0256-1.
- [6] A. Mehta, M. Prabhakar, P. Kumar, et al., Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders, *Eur J Pharmacol.* 698 (2013) 6-18.
doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.032.
- [7] A.E. Dief, E.S.Kamha, A.M. Baraka, et al., Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: A potential role for cyclic AMP protein kinase, *Neurotoxicology.* 42 (2014) 76-82. doi: 10.1016/j.neuro.2014.04.003.
- [8] M.B. Bogdanov, O.A. Tjurmina, R.J. Wurtman, Consumption of a high dietary dose of monosodium glutamate fails to affect extracellular glutamate levels in

the hypothalamic arcuate nucleus of adult rats, *Brain Res.* 736 (1996) 76-

81. doi:10.1016/0006-8993(96)00679-8

- [9] C. Vissienon, K. Nieber, O. Kelber, et al., Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin—are they prodrugs?, *J Nutr Biochem.* 23 (2012) 733-740. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.03.017.
- [10] P. Kumar, U. Bhandari, Protective effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn. on monosodium glutamate-induced dyslipidemia and oxidative stress in rats, *Indian J Pharmacol.* 45(2013):136-40. doi: 10.4103/0253-7613.108288.
- [11] SG Rosa, C.B. Quines, E.C. Stangherlin, et al., Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters, *Physiol Behav.* 155 (2016) 1-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.11.038.
- [12] I.S. Ochiogu, D. Ogwu, C.N. Uchendu, et al., Effects of monosodium-L-glutamate administration on serum levels of reproductive hormones and cholesterol, epididymal sperm reserves and testicular histomorphology of male albino rats, *Acta Vet Hung.* 63 (2015) 125-39. doi: 10.1556/AVet.2015.011.
- [13] S.J. López-Pérez, M.E. Ureña-Guerrero, A. Morales-Villagran, Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model, *Brain Res.* 1317 (2010) 246-256. doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.054.
- [14] C.B. Lima, G.S. Soares, S.M. Vitor, et al., Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex, *Life Sci.* 93 (2013) 388-392. doi: 10.1016/j.lfs.2013.07.009.

- [15] A.A.P. Leão, Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J. Neurophysiol.* 7 (1944) 359–390.
- [16] R.C.A. Guedes, Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR (eds.) *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Springer, Berlin, (2011) 2343-2355.
- [17] R.C.A. Guedes, R. Abadie-Guedes, R. S. Bezerra, The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants, *Nutr. Neurosci.* 15 (2012):111-119. doi: 10.1179/1476830511Y.00000000024.
- [18] M. Lauritzen, J.P. Dreier , M. Fabricius, et al., Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (2011) 17-35. doi: 10.1038/jcbfm.2010.191.
- [19] R.C. Cassilhas, S.Tufik, M.T. Mello, Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2015) 975-983. doi: 10.1007/s00018-015-2102-0
- [20] C. Pin-Barre, J. Laurin, Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke, *NeuralPlasticity*. 2015 (2015), Article ID 608581, 12 pagesdoi:10.1155/2015/608581.
- [21] C.B. Lima, G.S. Soares, S.M. Vitor, et al., Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate, *Int. J. Devel Neuroscience.* 33 (2014) 98-105. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.12.008.

- [22] K. Datta, D. Kumar, H.N. Mallick, Intragastric administration of glutamate increases REM sleep in rats, *Physiol Behav.* 12 (2013) 178-81. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.09.007.
- [23] D.S. Lima, L.M. Maia, E.A. Barboza, et al., L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats, *Life Sci.* 85 (2009) 241–247. doi: 10.1016/j.lfs.2009.05.017.
- [24] S. Gomes-Da-Silva, F. Dona, M.J. Da Silva Fernandes, et al., Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression, *Brain Dev.* 32 (2010) 137–142. doi: 10.1016/j.braindev.2008.12.012.
- [25] R. Abadie-Guedes, R.C.A. Guedes, R.S. Bezerra, The impairing effect of acute ethanol on spreading depression is antagonized by astaxanthin in rats of 2 young-adult ages, *Alcohol ClinExp Res.* 36 (2012): 1563-1567. doi: 10.1111/j.1530 0277.2012.01766.x.
- [26] R.F. Mendes-da-Silva, A.A.C. Lopes-de-Morais, M.E. Bandin-da-Silva, et al., 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 (2014) 155–160. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.027.
- [27] M. Batista-de-Oliveira, A.A. Lopes, R.F. Mendes-da-Silva, et al., Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis, *ExpGerontol.* 47 (2012) 452-457. doi: 10.1016/j.exger.2012.03.016.
- [28] I. González-Burgos, D.A. Velázquez-Zamora, C. Beas-Zárate, Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate

excitotoxicity, *Int. J. Devel Neuroscience* 27 (2009) 741–745. doi:

10.1016/j.ijdevneu.2009.08.016.

- [29] L. Hu, J.D. Fernstrom, P.C. Goldsmith, Exogenous glutamate enhanced glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice, *Neuroendocrinology*. 68 (1998) 77-88.
- [30] R.C.A. Guedes, E.A. Cavaleiro, Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam, *Epilepsy Res.* 27 (1997) 33–40. doi:10.1016/S0920-1211(96)01017-0.
- [31] D. Vecchia, D. Pietrobon, Migraine: a disorder of brain excitatory-inhibitory balance?, *Trends Neurosci.* 35 (2012) 507-20. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.007.
- [32] A. Shimada, L. Baad-Hansen, E. Castrillon, et al., Differential effects of repetitive oral administration of monosodium glutamate on interstitial glutamate concentration and muscle pain sensitivity, *Nutrition*. 31 (2015) 315–323. doi: 10.1016/j.nut.2014.07.011.
- [33] A. Ferrari, L. Spaccapelo, D. Pinetti, et al., Effective prophylactic treatments of migraine lower plasma glutamate levels, *Cephalalgia*. 29 (2009) 423–9. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01749.x.
- [34] S. Cull-Candy, S. Brickley, M. Farrant, NMDA receptor subunits: diversity, development and disease, *Curr Opin Neurobiol.* 11 (2001) 327-335. doi:10.1016/S0959-4388(00)00215-4.
- [35] X.X. Dong, Y. Wang, Z.H. Qin, Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Acta Pharmacol Sin.* 30 (2009), 379–387. doi: 10.1038/aps.2009.24.

- [36] D. Pietrobon, M.A Moskowitz, Pathophysiology of migraine, *Annu Rev Physiol.* 75 (2013) 365-391. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183717.
- [37] A. Shatillo, R.A. Salo, R. Giniatullin, et al., Involvement of NMDA receptor subtypes in cortical spreading depression in rats assessed by fMRI, *Neuropharmacology*.93 (2015) 164-70. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.01.028.
- [38] J.M. Smith, D.P. Bradley, M.F. James, et al., Physiological studies of cortical spreading depression, *Biol Rev CambPhilos Soc.* 81 (2006).457–481.
- [39] T.P. Obrenovitch, E. Zilkha, High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression, *J. Neurophysiol.* 73 (1995) 2107-2114.
- [40] D. Torrente, R.F. Mendes-da-Silva, A.A.C. Lopes, et al., Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats, *Neurosci Lett.* 558 (2014) 87– 90. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.004.
- [41] N. Zhou, R.L. Rungta, A. Malik, et al., Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression, *J Cereb Blood Flow Metab.* 33 (2013) 1582-1594. doi: 10.1038/jcbfm.2013.113.
- [42] E.O. Farombi, O.O. Onyema, Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin, *Hum ExpToxicol.* 25 (2006) 251-9.
- [43] A.L. Sheldon, M.B. Robinson, The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention, *Neurochem. Int.* 51 (2007). 333–355. doi:10.1016/j.neuint.2007.03.012.

- [44] E. Park, K.H. Yu, K. Kim, et al., Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death, *Food and Chemical, Toxicology*. 67 (2014) 1–9. doi: 10.1016/j.fct.2014.02.015.
- [45] D. Patel , P.S. Kharkar, M. Nandave, Emerging roles of system [Formula: see text] antiporter and its inhibition in CNS disorders, *MolMembr Biol*. 32 (2015) 89-116. doi: 10.3109/09687688.2015.1096972.
- [46] A. Malkov, A.I.Ivanov,I. Popova, et al., Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression, *J Cereb Blood Flow Metab*. 34 (2014) 1540–1549. doi: 10.1038/jcbfm.2014.121.
- [47] M. Netto, H. Martins-Ferreira, Elicitation of spreading depression by rose Bengal photodynamic action, *PhotochemPhotobiol*. 50 (1989) 229–234. doi: 10.1111/j.1751-1097.1989.tb04153.x
- [48] R.S. El-Bachá, J.L. Lima-Filho, R.C.A. Guedes, Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin, *NutrNeurosci*. 1 (1998) 205–212.
- [49] R. Abadie-Guedes, R.S. Bezerra, R.C.A. Guedes, Alpha-Tocopherol Counteracts the Effect of Ethanol on Cortical Spreading Depression in Rats of Various Ages, With and Without Ethanol Abstinence, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. (2016), in Press. doi: 10.1111/acer.12998
- [50] A.P. Rocha-de-Melo, J.B. Cavalcanti, A.S. Barros, et al., Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood, *NutrNeurosci*. 9 (2006) 155–160. doi:http://dx.doi.org/10.1080/10284150600903602

- [51] M.E. Ureña-Guerrero, S. Orozco-Suárez, S.J. López-Pérez, et al., Excitotoxic neonatal damage induced by monosodium glutamate reduces several GABAergic markers in the cerebral cortex and hippocampus in adulthood, *Int J Dev Neurosci.* 27 (2009) 845-855. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.07.011.
- [52] C.B. Quines, S.G. Rosa, J.T. Rocha, et al., Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young Rats, *Life Sciences.* 107 (2014) 27–31. doi: 10.1016/j.lfs.2014.04.032.
- [53] S.Y. Yau, J. Gil-Mohapel, B.R. Christie, et al., Physical exercise-induced adult neurogenesis: a good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases?, *Biomed Res Int.* 2014 (2014) Article ID 403120, 20 pages. doi: 10.1155/2014/403120.
- [54] C.X. Huang, X. Qiu, S. Wang, et al., Exercise-induced changes of the capillaries in the cortex of middle-aged rats, *Neuroscience.* 233 (2013) 139-45. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.046.
- [55] S.J. Colcombe, K.I. Erickson, P.E. Scalf, et al., Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 61(2006) 1166-70.
- [56] D.J. Duncker, R.J. Bache, Regulation of coronary blood flow during exercise, *Physiol Rev.* 88 (2008) 1009–1086. doi:10.1152/physrev.00045.2006.
- [57] S.Y. Yau, B.W. Lau, J.B. Tong, et al., Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behavior in stressed rats, *PLoS One.* 6 (2011) e 24263. doi: 10.1371/journal.pone.0024263.

- [58] P.C. Garcia, C.C. Real, A.F. Ferreira, et al., Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain, *Brain Res.* 1456 (2012), 36–48. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.059.
- [59] A.F. Ferreira, C.C. Real, A.C. Rodrigues, et al., Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain, *Brain Res.* 1361 (2010) 31–42. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.045.
- [60] E. Blomstrand, Amino acids and central fatigue, *Amino Acids.* 20 (2001) 25–34.
- [61] R. Meeusen, K. Thorré, F. Chaouloff, et al., Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res.* 740 (1996) 245–252. doi:10.1016/S0006-8993(96)00872-4
- [62] J. Wang, X. Chen, N. Zhang, et al., Effects of exercise on stress-induced changes of norepinephrine and serotonin in rat hippocampus, *Chin. J. Physiol.* 56 (2013) 245–252. doi: 10.4077/CJP.2013.BAB097.
- [63] H. M. C. Monteiro , N. Lima Barreto-Silva, G. Elizabete Dos Santos , et al., Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats, *Eur J Pharmacol.* 762 (2015) 49-54. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.027.
- [64] A. Amâncio-dos-Santos, P.C.F. Pinheiro, D.S. de Lima, et al., Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions, *Exp.Neurol.* 200 (2006) 275–282. doi:10.1016/j.expneurol.2006.02.014

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados *in vivo* do presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Os efeitos neurais do MSG e do exercício físico no início da vida são determinantes importantes para as alterações eletrofisiológicas no córtex cerebral.
- O córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao exercício físico em esteira tornou-se mais resistente (ou menos susceptível) à DAC; situação oposta ocorreu sob a ação do MSG administrado via oro-gástrica.
- Electrofisiologicamente foi caracterizado um novo efeito do MSG aplicado topicamente no córtex cerebral de ratos jovens, e foi confirmada a ação do MSG administrado sistemicamente (por gavagem) sobre a DAC, observada em trabalho anterior de nosso laboratório.
- As diferentes vias de administração estudadas (oro-gástrica e tópica) exerceram importante efeito modulador das respostas eletrofisiológicas; tendo em vista seus efeitos opostos.
- Os dois fatores –MSG e exercício– apresentaram interação no que se refere aos seus efeitos eletrofisiológicos

7.1 Perspectivas

Algumas perspectivas são sugeridas para a continuidade do presente estudo:

- Avaliar os efeitos do MSG sobre a DAC utilizando fármacos, para testar o envolvimento dos sistemas glutamatérgico, GABAérgico, dopaminérgico, de opióides e serotoninérgico, nos mecanismos neuroquímicos associados a esse efeito.
- Mensurar níveis cerebrais de glutamato em animais tratados com MSG, objetivando correlacioná-los com os efeitos eletrofisiológicos descritos.

- Avaliar os efeitos da interação MSG/exercício em diferentes condições nutricionais como a desnutrição e hipernutrição.
- Correlacionar os achados deste trabalho com os padrões de comportamento nas mesmas condições de exercício e de tratamento com MSG. Os experimentos para essa investigação já estão em andamento.
- A administração do MSG associada a modelos experimentais que mimetizem desordens neurológicas, como a epilepsia do lobo temporal, utilizando como modelo de indução a pilocarpina, em associação ao exercício físico.
- Fazer análises histoquímicas referentes à imuno-marcadores neuronais e gliais, correlacionando com os resultados eletrofisiológicos obtidos.
- Analisar eletrofisiologicamente possíveis efeitos neuroprotetores de agentes antioxidantes sobre as possíveis ações neurotóxicas induzidas pelo MSG.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, N. E. et al. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International Journal of Developmental**, v. 30, n. 5, p. 405-10, 2012.
- ABADIE-GUEDES, R. et al. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcohol Clin.Exp Res**, v. 32, p. 1417–1421. 2008.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, n.2, p.275-282, 2006.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. et al. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 70-75, 2013.
- ANDRAS, I.E. et al. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.27, p. 1431-1443, 2007.
- ANDREAZZI, A.E. et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **J Endocrinol**, v. 201, p. 351-359, 2009.
- ANGELIS, K. et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *j appl physiol.* 96(6):2174-8, 2004.
- AUTIO, J.A. et al. Parenchymal spin-lock fMRI signals associated with cortical spreading depression. **J.Cereb.Blood FlowMetab**, v. 34, p. 768-775, 2014.
- BATISTA-de-OLIVEIRA, M. et al. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Exp Gerontol**, v. 47, p. 452-457, 2012.
- BELLISLE, F. Experimental studies of food choices and palatability responses in European subjects exposed to the Umami taste. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17, p. 376-9, 2008.
- BEYREUTHER, K. et al. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. **Eur J ClinNutr**. v. 61(3), p. 304-13, 2007.
- BOGDANOV, M.B.; WURTMAN, R.J. Effects of systemic or oral ad libitum monosodium glutamate administration on striatal glutamate release, as measured using microdialysis in freely moving rats. **Brain Res**, v.660, p. 337-340, 1994.

BOULE, N.G. et al. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA [S.I.]*, v. 286, n. 10, p. 1218-27, 2001.

BLACHIER, F. et al. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr.* v. 90(3), p. 814-821, 2009.

BERCHTOLD, N.C.; CASTELLO, N.; COTMAN, C.W. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience**, v.167, p. 588-597, 2010.

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

CASSILHAS, R.C.; TUFIK, MELLO, M.T. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. **Cell. Mol. Life Sci**, [Epub ahead of print], 2015.

CECHETTI, F. et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiol. Learn Mem**, v. 97, p. 90–96, 2012.

CHANG, Y.K. et al. The effects of acute exercise on cognitive performance: a meta-analysis. **Brain Res**, v. 1453, p. 87-101, 2012.

COSTA-CRUZ R.R.G.; GUEDES R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neurosc. Lett.** 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

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol. Rev**, v. 53, p. 135-159, 2001.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 1-105, 2001.

DATTA, K.; KUMAR, D.; MALLICK, H.N. Intragastric administration of glutamate increases REM sleep in rats. **PhysiolBehav.**, v.122, p.178-81, 2013.

DENGEL, D.R. et al. Improvements in blood pressure, glucose metabolism, and lipoprotein lipids after aerobic exercise plus weight loss in obese, hypertensive middle-aged men. *Metabolism [S.I.]*, v. 47, n. 9, p. 1075-82, 1998.

DESPRÉS, J.P. Physical Activity, Sedentary Behaviours, and Cardiovascular Health: When Will Cardiorespiratory Fitness Become a Vital Sign? **Can J Cardiol.** v. 32, p. 505-13, 2016.

DISHMAN, R.K. et al. Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring) [S.I.]*, v. 14, n. 3, p. 345-56, Mar 2006.

DIEF, A.E. et al., Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: A potential role for cyclic AMP protein kinase. **Neurotoxicology**, v. 42, p. 76-82, 2014.

DREIER, J.P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nat Med**, v. 17, p. 439–47, 2011.

EIKERMANN-HAERTER, K.; MOSKOWITZ, M.A. Animal models of migraine headache and aura. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 21, p. 294-300, 2008.

EL-MEGHAWRY EL-KENAWY, A.; OSMAN, H.E.; DAGHESTANI, M.H. The effect of vitamin C administration on monosodium glutamate induced liver injury. An experimental study. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.65, p. 513– 521, 2013.

EWEKA, A.O.; OM'INIABOHS, F.A.E. Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the inferior colliculus of adult wistar rats. **Rev Electron Biomed Electron J Biomed**,v.3, p. 24–30, 2008.

FARIAS-SANTOS, R.C. et al. 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.

FABRICIUS, M. et al. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. **ClinNeurophysiol**, v. 119, p. 1973–1984, 2008.

FAROMBI, E.O.; ONYEMA, O.O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. **Hum ExpToxicol**, v.25, p.251–259, 2006.

FANG, Z.H. et al. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. **Neurosci Res.**, v.74, p.187-194, 2013.

FERRARI, M.D. et al. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. **Lancet Neurol**, v.14, p. 65-80, 2015.

FLORES-SOTO, M.E. et al. Receptor to glutamate NMDA-type: the functional diversity of the NR1 isoforms and pharmacological properties. **Curr Pharm Des**, v 19, p. 6709-6719, 2013.

FREEMAN, M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: a literature review. **J Am Acad Nurse Pract**, v.18 (10), p.482-6, 2006.

GARATTINI, S. Glutamic Acid, Twenty Years Later. **J. Nutr**, v 130, p. 901-909, 2000.

GARCIA, P.C. et al., Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. **Brain Res**, v. 1456, p. 36–48, 2012.

GEHA, R.S. et al. Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. **J Allergy Clin Immunol.** v.5 p. 973–980, 2000a.

GEHA, R.S. et al. Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. **J Nutr.** 130 (Suppl. 4S), 1058–1062, 2000b.

GOMES-DA-SILVA, S. et al. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain Dev.**, v. 32, p. 137–142, 2010.

GONZÁLEZ-BURGOS, I.; VELÁZQUEZ-ZAMORA, D.A.; BEAS-ZÁRATE, C. Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. **Int. J. Devel Neuroscience**, v. 27, p. 741–745, 2009.

GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, v. 38, n. 1, p.33–60, 2001.

GREWER C, GAMEIRO A, RAUEN T. SLC1 glutamate transporters. **Pflugers Arch**, v. 466, p. 3-24, 2014.

GUDINÕ-CABRERA, G. et al. Excitotoxicity Triggered by Neonatal Monosodium Glutamate Treatment and Blood-Brain Barrier Function. **Archives of Medical Research**, v. 45, p. 653-659, 2014.

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, p. 341-349, 1980.

GUEDES, R.C.A. et al. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 923-925, 1989.

GUEDES, R.C.A.; 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.; 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.

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

GUEDES, R.C.A. et al. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional Neuroscience**.v.16, p. 142-146. 2013.

HANBURY, R. et al. GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults. **J Comp Neurol**, v. 461, p. 307–316, 2003.

HASHEM, H.E.M.; EL-DIN, S.M.; ALGAIDI, S. The effect of monosodium glutamate on the cerebellar cortex of male albino rats and the protective role of vitamin C (histological and immunohistochemical study). **J MolHist**, v.43, p.179–186, 2012.

HOLDER, M.D.; YIRMIYA, R. Behavioral assessment of the toxicity of aspartame. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 32, p. 17-26, 1989.

HORVATH, G. et al. Exposure to Enriched Environment Decreases Neurobehavioral Deficits Induced by Neonatal Glutamate Toxicity. **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 19054–19066, 2013.

HU, L.; FERNSTROM, J.D.; GOLDSMITH, P.C. Exogenous glutamate enhances glutamate receptor subunit expression during selective neuronal injury in the ventral arcuate nucleus of postnatal mice. **Neuroendocrinology**, v. 68, p. 77-88, 1998.

HUNT, W.T. et al. Protection of cortical neurons from excitotoxicity by conjugated linoleic acid. **journal of neurochemistry**, v.115, p. 123-30, 2010.

JIN, Y.J. et al. BDNF levels in adipose tissue and hypothalamus were reduced in mice with MSG-induced obesity. **Nutr Neurosci**, v. 18, p. 376-82, 2015.

JINAP, S.; HAJEB, P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. **Appetite**. v. 55 (1), p. 1-10, 2010.

KLUMPP, S. et al. Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: a prerequisite for their biological activity. **Neurochem Int**, v. 48, p. 131-137, 2006.

KNAEPEN, K. et al. Neuroplasticity-exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. **Sports Med**, v. 40, p. 765-801, 2010.

KARACABEY, K. Effect of regular exercise on health and disease. **Neuro Endocrinol. Lett**, v. 26, p. 617-623, 2005.

KOGA, M. et al. Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, p. 596-602, 2011.

KRAMER, D.R. et al. Cortical spreading depolarization: Pathophysiology, implications, and future directions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 24, p. 22-27, 2015.

LAKKA, T.A.; LAAKSONEN, D.E. Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Appl Physiol Nutr Metab**. v.32, p.76-88, 2007.

LAU, Y.S. et al. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **Eur. J. Neurosci**, v.33, p.1264–1274, 2011.

- LEE, D.C. et al. Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk. **J Am CollCardiol**, v. 64, p. 472–481, 2014.
- LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiol.**, v.7, p.359–390, 1944a.
- 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. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiol.**, v.10, p.409-414, 1947.
- LEÃO A.A.P. The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. **Journal of Neurophysiology**, v. 3 (3), p. 315-321, 1951.
- LEEDS, P. et al. Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. **Neurochem Int.**, v. 46, 61-72, 2005.
- LEHMENKUEHLER, A. et al. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. **Neuroscience**, v. 55, p. 339-351, 1993.
- LIMA, C.B. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. **Life Sci**, v.93, p.388-392, 2013.
- LIMA, C.B. et al. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **Int. J. Devl Neuroscience**, v.33, p.98-105, 2014.
- LIMA, D.S.C. et al. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v. 85, p. 241-247, 2009.
- LIU, Z.; MU, S.; WANG, X. Effect of estrogen on recovering the injured nervous system. **Pak J Pharm Sci.**, v. 28, p. 1471-1475, 2015.
- LOPES-DE-MORAIS, A.A.C. et al. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Research**, v. 1591, p. 93-101, 2014.
- LÓPEZ-PÉREZ, S.J.; UREÑA-GUERRERO, M.E.; MORALES-VILLAGRAN, A. Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. **Brain Res**, v. 1317 246-256, 2010.
- MARTINEZ-CONTRERAS, A. et al. Astrocytic and microglia cells reactivity induced by neonatal administration of glutamate in cerebral cortex of adult rats. **J Neurosci Res.**, v. 67, p. 200-210, 2002.
- MATUTE, C. et al. Excitotoxicity in glial cells. **Eur. J. Pharmacol**, v.447, p.239-246, 2002.

MCCALL, A. et al. Monosodium glutamate neurotoxicity, hyperosmolarity, and blood-brain barrier dysfunction. **Neurobehav Toxicol**, v.1, p. 279-283, 1979.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol**, v. 698, p. 6-18, 2013.

MENDES-DA-SILVA, R.F. et al. 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.

MIRANDA, R.A. et al. Swim training of monosodium L-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. **Endocrine**, v. 43, p. 571-8 2013.

MONNO, A. et al. Extracellular glutamate levels in the hypothalamus and hippocampus of rats after acute or chronic oral intake of monosodium glutamate. **Neuroscience Letters**, v. 007A193 p. 45-48, 1995.

MONTE-GUEDES, C.K.R. et al. Chronic treatment with ascorbic with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing wellnourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, p. 191-94, 2011.

MONTEIRO, H.M.C. et al. Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. **Eur J Pharmacol**, v, 762, p. 49-54, 2015.

MONTESI, L. et al. Physical activity for the prevention and treatment of metabolic disorders. **Internal and Emergency Medicine**, v. 8, p. 655-666, 2013.

MORAES-SILVA, I.C. et al. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. **J Appl Physiol**, v. 114, p. 786-91, 2013.

MORGANE, P.J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

MOURITSEN, O.G. Umami flavour as a means of regulating food intake and improving nutrition and health. **Nutrition and Health**. v. 21, p. 56-75, 2012.

MURUGAN, M.; LING, E.A.; KAUR, C. Glutamate receptors in microglia. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, p. 773-784, 2013.

MUSA, M.; SUNDAY, A.M. Clumping of the Nuclei Material of Pyramidal Cells of Adult Wistar Rats Following Oral Administration of Monosodium Glutamate. **Research and Reviews: Journal of Medical and Health Sciences**, v.2, p.10-15, 2013.

OTA, Y.; ZANETTI, A.T.; HALLOCK, R.M. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. **Neural Plast**, v. 2013, article ID:185463, 11 pages, 2013.

PARK, J.H. et al. Comparison of glucocorticoid receptor and ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity in the adult and aged gerbil hippocampus following repeated restraint stress. **Neurochem Res.**, v. 36, p. 1037–1045, 2011.

PIN-BARRE, C.; LAURIN, J. Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. **Neural Plasticity**, v. 2015 Article ID 608581, 12 pages, 2015.

PUSIC, D.A. et al. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental Neurology**, v. 264, p. 43-54, 2015.

REAL, C.C.; FERREIRA, A.F.; HERNANDES, M.S. Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain. **Brain Res**, v. 1363, p. 63–71. 2010.

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.

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

ROTHMAN, S.M.; MATTSON M.P. Activity-Dependent, Stress-Responsive Bdnf Signaling And The Quest For Optimal Brain Health And Resilience Throughout The Lifespan. **Neuroscience**, v.239, p.228–240, 2013.

SADEGHIAN, H. et al. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. **Exp Neurol.**, v. 233, p. 438-446, 2012.

SANACORA, G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Reviews**, v. 7, 426-37, 2008.

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

SAVELA, S. et al. STRANDBERG T.E. Leisure-time physical activity, cardiovascular risk factors and mortality during a 34-year follow-up in men. **Eur J Epidemiol**, v. 25, p. 619–625, 2010.

SCHELLER, D. et al. 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, n. 3-4, p. 571-583, 2000.

SHEN, J.Z. et al. Pentamethylquercetin generates beneficial effects in monosodium glutamate-induced obese mice and C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. **Diabetologia**, v.55, p. 1836–1846, 2012.

SMITH, J.M. et al. Physiological studies of cortical spreading depression. **Biol. Rev. Camb Philos. Soc**, v. 81, p. 457-481, 2006.

SOUZA, M.A. et al. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50 p. 811-23, 2009.

STAPLES, M.C.; SOMKUWAR, S.S.; MANDYAM, C.D. Developmental effects of wheel running on hippocampal glutamate receptor expression in young and mature adult rats. **Neuroscience**, v. 305, p. 248-56, 2015.

SUMEC, R. et al. Psychological Benefits of Nonpharmacological Methods Aimed for Improving Balance in Parkinson's Disease: A Systematic Review. **Behav Neurol**, 2015:620674, 2015. doi: 10.1155/2015/620674.

TREJO, J.L.; CARRO, E.; TORRES-ALEMAN, I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **J Neurosci**, v. 21, p. 1628-1634, 2001.

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.

VARMA, V.R. et al. Low-intensity daily walking activity is associated with hippocampal volume in older adults. **Hippocampus**, v. 25, p. 605-15, 2015.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, n. 4, p. 283-95, 2005.

VIANA, L.C. et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v. 238, p. 280-296, (2013).

VISSIENNON, C. et al. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin-are they prodrugs? **J NutrBiochem**, v.23, p. 733-740, 2012.

WAGGAS A.M. Neuroprotective Evaluation of extractor of Ginger (*Zingiber officinale*) Root in Monosodium Glutamate-Induced Toxicity in Different Brain Areas Male Albino Rats. **Pakistan journal of Biological Sciences**, v.12, p. 201-212, 2009.

WALKER, R. The significance of excursions above the ADI. Case study: monosodium glutamate. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v.30, p.119-121, 1999.

WANG, Y.; QIN, Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, p. 1382-1402, 2010.

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

XIMENES-DA-SILVA A, GUEDES RCA. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 24, p. 1277-1281, 1991.

YAMAGUCHI, S.; NINOMIYA, K. Umami and Food Palatability. **J.Nutr.** v. 130, p. 921–926, 2000.

YAU, S.Y. et al. Physical exercise-induced adult neurogenesis: a good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? **Biomed Res Int**, v. 2014; 2014: 403120.doi: 10.1155/2014/403120.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm**, v. 121, p. 799-817, 2014.

ZHOU, N. et al. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 33, p. 1582-1594, 2013.

ZHU, Z. et al. Central expression and anorectic effect of brain-derived neurotrophic factor are regulated by circulating estradiol levels. **Horm Behav.** v. 63, p. 533–42, 2013.

ANEXO A

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, 05 de setembro de 2014.

Ofício nº 47/2014

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araujo Guedes**
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016858/2014-11

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, **"Ação eletrofisiológica cerebral do glutamato monossódico em ratos em desenvolvimento: o papel da via de administração e do exercício físico sobre a depressão alastrante cortical."**

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

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE; Animais: ratos. Linhagem: Wistar; Idade: 0-65 dias; Peso: 0-250g; Sexo: machos; Nº total de animais: 60.

Atenciosamente,

Profª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUACCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B

Confirmação da submissão do artigo ao periódico

Fwd: Submission Confirmation

De: **Rubem Guedes** (guedes.rca@gmail.com)
Enviada: quarta-feira, 27 de janeiro de 2016 16:22:24
Para: suenia marcele vitor (susu_ca_@hotmail.com)

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

From: **Life Sciences** <lifesci@elsevier.com>
Date: 2016-01-27 14:18 GMT-02:00
Subject: Submission Confirmation
To: guedes.rca@gmail.com, rguedes@ufpe.br

Dear Prof. Guedes,

Your submission entitled "Opposite effects of oral versus topical treatment with monosodium glutamate on cortical spreading depression in exercised and sedentary rats" has been received by Life Sciences

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/lfs/>.

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Life Sciences