

LARISSA DE BRITO MEDEIROS

Soro do leite caprino e depressão alastrante cortical e memória em
ratos albinos: papel do ácido siálico

Recife – PE

2016

LARISSA DE BRITO MEDEIROS

Soro do leite caprino e depressão alastrante cortical e memória em
ratos albinos: papel do ácido siálico

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

Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Coorientadora: Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga

Recife – PE

2016

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

M488s Medeiros, Larissa de Brito.
Soro do leite caprino e depressão alastrante cortical e memória em
ratos albinos: papel do ácido siálico / Larissa de Brito Medeiros.– 2016.
84 f.: il.; tab.; 30 cm.

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

1. Ácido siálico. 2. Memória. 3. Desnutrição. I. Guedes, Rubem
Carlos Araújo (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-197)

LARISSA DE BRITO MEDEIROS

**SORO DO LEITE CAPRINO E DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL E
MEMÓRIA EM RATOS ALBINOS: PAPEL DO ÁCIDO SIÁLICO**

Dissertação aprovada em 18/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. ÂNGELA AMÂNCIO DOS SANTOS
Examinadora Interna

Prof^a. Dr^a. CILENE REJANE RAMOS ALVES
Examinadora Externa

Prof^a. Dr^a. LUCIANA MARIA SILVA DE SEIXAS MAIA
Examinadora Externa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Reitor

Profº. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Profº. Sílvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Profº. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro De Ciências Da Saúde

Profº. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro De Ciências Da Saúde

Prof.^a Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Nutrição

Prof.^a Alda Verônica Souza Livera

Vice-Chefe do Departamento de Nutrição

Prof.^a Juliana Maria Carrazzone Borba

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof.^a Elizabeth do Nascimento

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof.^a Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o qual é responsável por toda minha inspiração e dedicação durante esses dois anos.

À minha mãe, Suzana Mércia Cavalcante de Brito e à minha irmã Vanessa de Brito Medeiros, por todo amor e apoio prestado em cada fase da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível. Dedico toda a minha gratidão. Não poderia deixar de lembrar do meu cunhado, José Walter Jansen, por todo o apoio prestado.

Ao meu namorado, Danilo Costa Gomes, que me apoiou em todas as minhas decisões, me ajudou nos momentos difíceis e sempre teve bastante paciência e compreensão durante todo o decorrer do mestrado. Obrigada por todas as idas a Recife nos finais de semana e toda a ajuda nos experimentos. Sem você tudo seria mais difícil. Obrigada por acreditar em mim.

Aos meus avós paternos, Fernando Dinoá Medeiros e Maria (Mércia) Guedes Medeiros, por todo o apoio, compreensão das ausências e por sempre acreditarem no meu potencial.

A minha avó Selma Cavalcante, aos meus tios e primos por sempre se fazerem presentes em minha vida. E não poderia esquecer do meu querido avô, Petrônio de Farias Brito (*in memoriam*), um exemplo de sabedoria e humildade que me incentiva a trilhar um dos caminhos mais valiosos da vida: conhecimento.

Ao meu filho canino, Sushi Brito, por todo o carinho e solidariedade nos momentos mais difíceis.

À querida família de Danilo Gomes (Giuliana, Iury, Hector, Tarsila, Daniel, Igor, Ianes, Rô e Marcos Victor), em especial Alfredo Gomes Neto e Cristina Grécia, por todo o apoio, compreensão e carinho. Obrigada por tudo.

Às minhas amigas e companheiras acadêmicas Suênia Lima e Regina Benevides. Só nós sabemos o que passamos durante todo esse período. Todas as dificuldades, tristezas e angústias superadas foram mais fáceis porque tinha vocês ao meu lado. A nossa amizade extrapola a barreira da Universidade. Muito obrigada por tudo.

Às amigas de mestrado Janatar Stella, Laís Ribeiro e Patrícia Fortes. Vocês foram especiais e tornaram todo esse período mais prazeroso.

Às companheiras de pensão Bruna Mille, Natália Vargas, Juliana Freire e Neide por todas as caronas a pé, comidas, conversas de apoio e carinho. Muito obrigada por tudo. Vocês foram grandes presentes em minha vida.

Às companheiras paraibanas Bárbara Costa e Neusa Lygia essenciais no período inicial do mestrado. Muito obrigada pelas conversas e carinho.

Às minhas amigas Camila Nóbrega, Lara Nóbrega e Elizeane Lucena, pelas conversas, conselhos, carinho e companheirismo. Em especial à Camila pela hospedagem em Recife e suporte ao final dos experimentos.

Às minhas amigas Priscilla Vasconcelos, Susana Freire, Sabrina Freire, Nathália Assis, Ingrid Gianni e Danielle Torres. Obrigada pelo apoio em momentos de felicidade e tristeza. A amizade de todos foi fundamental durante esse período de renúncias.

Às colegas do LAFFINT Denise, Rosângela, Elian, Mariana e Nora pelas ajudas nos experimentos e pelas conversas confortadoras.

À Dra. Josianny por todo o suporte e carinho durante essa fase intensa da minha vida. Muito obrigada.

À Sandra Valéria, por todo o auxílio prestado durante esse período. Obrigada por todo o carinho.

Ao Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) pela disponibilidade de espaço e equipamentos necessários à realização da pesquisa. Agradeço imensamente a todos que o constituem pelo acolhimento.

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

Aos professores Ângela Amâncio dos Santos e Ricardo Abadie Guedes pelos conselhos e importante contribuição à minha dissertação.

Ao Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias (CCHSA) da UFPB pelo fornecimento do leite de cabra.

Ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição da UFPB pelo fornecimento do soro utilizado na presente pesquisa. Em especial, à Yasmim Régis pelo suporte na construção dos dados referentes ao soro do leite de cabra.

A minha coorientadora Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, pelas palavras de carinho e suporte. Obrigada também pela disponibilidade de recursos para a realização da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Rubem Carlos Araújo Geudes, pela paciência, dedicação e ensinamentos. Um exemplo de humildade, inteligência e responsabilidade que sempre levarei como um exemplo na minha formação acadêmica.

RESUMO

O soro do leite de cabra (SORO), subproduto geralmente descartado durante a fabricação do queijo, é uma boa fonte de ácido siálico (Sia), oligossacarídeo envolvido em processos como memória e excitabilidade cerebral. Neste estudo, investigamos em ratos os efeitos do SORO em pó sobre a memória e a depressão alastrante cortical (DAC), fenômeno relacionado à excitabilidade cerebral, fornecendo evidências para o envolvimento do Sia nesse efeito. Além disso, avaliamos se a deficiência nutricional modularia a ação do SORO. Ratos Wistar foram amamentados em ninhadas com 9 e 15 filhotes (grupos L₉ e L₁₅, respectivamente). Nos dias pós-natais (P) 7 a 14, os animais receberam por gavagem 17,45 g/kg/d de SORO, ou Sia (20 mg/kg/d, ou 100 mg/kg/d). No P28-30, testamos a memória dos animais (tarefa de reconhecimento de objetos, TRO). No P35-45 registramos a DAC e analisamos a sua velocidade de propagação, amplitude e duração. Na TRO, os ratos L₁₅ tratados com o SORO obtiveram melhor desempenho do que os controles-L15. Os ratos L₁₅ exibiram velocidades da DAC mais elevadas em comparação com os grupos L₉. Os grupos SORO e Sia exibiram velocidade da DAC mais elevada que os grupos naïve e salina, independentemente do estado de lactação ($p < 0,05$). Nossos resultados documentaram este efeito do SORO na memória e DAC. Sia facilitou a DAC de forma dose-dependente, sugerindo seu envolvimento nessa ação do SORO. Este é considerado um suplemento potencial para melhorar a função e desenvolvimento do cérebro em crianças desnutridas. Mais estudos são necessários para investigar tal potencial.

Palavras-chave: Soro de leite de cabra. Ácido siálico. Depressão alastrante. Memória. Desenvolvimento cerebral.

ABSTRACT

Goat Whey, a usually discarded byproduct from goat cheese manufacturing, is a good source of sialic acid (SA), an oligosaccharide that is involved in processes such as memory and brain excitability. Here, we investigated in rats the effect of dried goat whey (DGW) on memory and the brain excitability-dependent phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). We also provide evidence for the involvement of SA in this effect. In addition, we tested animals under unfavorable suckling conditions to evaluate whether nutritional deficiency would modulate DGW action. Wistar rats were suckled in litters with 9 and 15 pups (groups L9 and L15, respectively). From postnatal (P) days 7 to 14, the animals received per gavage 17.45 g of DGW/kg/d, or SA (20 mg/kg/d, or 100 mg/kg/d). At P28-30, we tested the animals' memory in the object recognition paradigm. At P35-45 we recorded CSD and analyze its velocity of propagation, amplitude, and duration. In the object recognition test, the L15 DGW-treated rats performed better than the L15-controls. The L15 rats displayed higher CSD velocities compared with L9 groups. The DGW and SA groups exhibited higher CSD velocity than the naïve- and saline-treated controls, regardless the lactation status ($p < 0.05$). Our results documented a novel effect of DGW on memory and CSD. SA dose-dependently facilitated CSD, suggesting its involvement on the DGW action. DGW is considered a potential supplement to improve brain development and function in malnourished children, and this shall be further translationally investigated.

Keywords: Goat whey. Sialic Acid. Spreading depression. Memory. Brain development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular dos membros da família do Ácido Siálico	18
Figura 2. Síntese do Neu5Ac	20
Figura 3. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da DAC	30
Figura 4. Representação esquemática dos grupos deste trabalho	39

FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Pesos corporais dos grupos estudados	51
Figura 2. Registros eletrofisiológicos dos animais	52
Figura 3. Velocidade de propagação da DAC dos grupos estudados	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas condições que facilitam a propagação da DAC	31
Tabela 2. Algumas condições que dificultam a propagação da DAC	32
Tabela 3. Composição físico-química do soro do leite caprino em pó	37

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Composição físico-química do soro do leite caprino em pó	48
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CSD	Cortical spreading depression
DAC	Depressão alastrante cortical
DGW	Dried goat whey
ECoG	Eletrocorticograma
KDN	2-keto-3-deoxy-nonulosonic acid, ketodeoxynonulosonic acid)
L15	Unfavorable lactation/Lactação desfavorável
L9	Normal lactation/Lactação normal
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
LTP	Potenciação de longa duração
NADNA	N-Acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid
NEU	Neuraminidase
Neu5Ac	Ácido N-Acetilneuramínico; N-Acetylneuraminic acid
Neu5Gc	Ácido N-Glicolilneuramínico; N-Glycolylneuraminic acid
NRC	National Research Council
Nv	Naïve/Ingênuo
Sia	Ácido siálico
SIGLECS	Lectinas semelhantes a imunoglobulinas
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLV	Variação lenta de voltagem

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE DE CABRA	15
2.2 ÁCIDO SIÁLICO	18
2.2.1 Ácido siálico e função neural	22
2.2.2 Ácido siálico e excitabilidade do sistema nervoso	25
2.3 DESNUTRIÇÃO E FUNÇÃO NEURAL	27
2.4 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	30
3 HIPÓTESE	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 ÁCIDO N-ACETILNEURAMÍNICO	37
5.2 SORO DO LEITE DE CABRA EM PÓ	37
5.3 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.4 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	40
5.5 DETERMINAÇÕES DE PESO CORPORAL	42
5.6 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	42
5.7 EUTANÁSIA	43
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6 NEONATAL ADMINISTRATION OF GOAT WHEY MODULATES MEMORY AND CORTICAL SPREADING DEPRESSION IN RATS PREVIOUSLY SUCKLED UNDER DIFFERENT LITTER SIZES: POSSIBLE ROLE OF SIALIC ACID	44
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
7.1 PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	68
ANEXO - A	83
ANEXO - B	84

1 APRESENTAÇÃO

O desenvolvimento cerebral dos mamíferos é um fenômeno complexo que envolve o seu crescimento anatômico, além de muitos processos bioquímicos, fisiológicos e psicológicos (WANG, 2012). A desnutrição precoce pode alterar vários eventos maturacionais neurais, resultando, ao longo da vida, em anormalidades de comportamento, alterações no funcionamento cognitivo e distúrbios de aprendizagem e memória (MORGANE; MOKLERA; GALLER, 2002).

Alguns nutrientes específicos têm se mostrado de grande importância no processo de desenvolvimento cerebral. Este é o caso do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), a forma predominante em humanos da família do Ácido Siálico (Sia). Esta família consiste em açúcares de 9 carbonos derivado do Ácido Neuramínico (WANG, 2012).

A maior concentração de Ácido Siálico é encontrada no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, em sua maioria como parte estrutural e funcional em gangliosídeos e glicoproteínas. Nessas estruturas, os resíduos de ácido siálico no córtex frontal provavelmente participam do reconhecimento de células, formação do contato célula-célula, ligação e modulação de receptor, propriedades imunológicas, transdução de sinais, entre outras (WANG; BRAND-MILLE, 2003). Além disso, o Sia também é encontrado na molécula de adesão celular neuronal (NCAM) em forma de polímero, chamado de Ácido Polisiálico (PSA), e a PSA-NCAM tem sido considerada fundamental para o mecanismo de formação da memória (RUTISHAUSER, 2008).

O Sia está presente no leite materno, principalmente conjugado aos oligossacarídeos. Embora não sejam conhecidos os mecanismos, sabe-se que o cérebro incorpora uma grande quantidade de Sia durante o desenvolvimento (SVENNERHOLM et al., 1989; WANG et al., 1998). Estudos mostram que crianças amamentadas quando bebês atingiram maior pontuação em testes de inteligência do que aquelas alimentadas com leite não humano (ISAACS, 2010; LUCAS et al, 1992, 1998), concluindo-se que é muito possível que algum benefício da amamentação seja devido ao conteúdo nutricional original do leite humano. Logo, o ácido siálico pode ser, dentre outros, um nutriente essencial envolvido em tal benefício.

Há vários estudos que mostram as vantagens do aleitamento materno, mas não há evidências diretas acerca do mecanismo pelo qual o leite humano pode melhorar, ou as fórmulas infantis podem prejudicar o crescimento cognitivo (WANG; BRAND-MILLE, 2003). Entretanto, existem pesquisas em que a quantidade de ácido siálico fornecida pelo leite

está correlacionada com a melhora de aprendizagem e memória de animais (WANG et al, 2007; MORGAN; WINICK, 1980) e de crianças (WU et al., 2014).

Apesar de nenhuma fórmula infantil única poder replicar a natureza dinâmica do Neu5Ac no leite materno durante o curso da lactação (WANG, 2012), a qualidade da fonte do ácido siálico disponível pode ser melhorada se o leite de cabra for utilizado em substituição ao leite de vaca. O leite de cabra possui um perfil de Neu5Ac mais comparável ao do leite humano (VIVERGE et al., 1997), além de ter 5 vezes mais oligossacarídeos (OS) do que o leite bovino (250-300 mg/L contra 60-90 mg/L), principal forma em que o ácido siálico está conjugado. Como a obtenção de OS a partir do leite de cabra pode ser cara, utilizar subprodutos como o soro do leite pode ser uma alternativa mais econômica e viável (OLIVEIRA et al., 2012a).

Tendo em vista as diversas funções biológicas do Neu5Ac sobre o desenvolvimento e funcionamento do Sistema Nervoso, pode-se concluir que é importante a caracterização dos seus efeitos sobre as possíveis ações neurofisiológicas. Tem-se conhecimento da influência do Neu5Ac endógeno sobre o aumento da excitabilidade no hipocampo (SAVOTCHENKO et al., 2015; ISAEVA et al., 2011; ISAEV et al., 2011; SAVRASOVA, et al., 2010; ISAEV et al, 2007) e nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (PENG et al., 2004), bem como sobre o processo de mielinização (YOO et al., 2015; PROLO; VOGEL; REIMER, 2009). Nesse contexto, o presente projeto visa estudar, em ratos albinos, possíveis ações do Neu5Ac sintético e do soro do leite de cabra sobre a atividade elétrica cerebral e comportamental. Para isto, será utilizado o fenômeno denominado depressão alastrante da atividade elétrica cortical, ou simplesmente “depressão alastrante cortical” (DAC) e os testes de reconhecimento de objetos, respectivamente. Adicionalmente, pretende-se investigar se tais ações seriam modificadas por manipulações do estado nutricional dos animais, durante o período de desenvolvimento cerebral mais intenso.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE DE CABRA

A cabra é um fornecedor importante de produtos lácteos e carne para a população rural em vários países (HAENLEIN, 2004), incluindo o Brasil, onde na região nordeste se destaca o estado da Paraíba como o principal produtor de leite de cabra na região (OLIVEIRA et al., 2011). A habilidade da cabra de proporcionar alimentação de alta qualidade sob condições ambientais diversas faz com que esse animal tenha um papel importante na nutrição humana (SILANIKOVE et al., 2010). Como uma iniciativa de estimular o desenvolvimento econômico nas áreas rurais do Brasil, o leite de cabra é vendido para o governo e usado em programas sociais (OLIVEIRA et al., 2011).

A utilização do leite de cabra em alimentos funcionais e infantis tem sido cogitada devido à sua composição nutricional que vem chamando atenção de pesquisadores de todo o mundo (SILANIKOVE et al., 2010), principalmente pelos seus efeitos benéficos para a manutenção da saúde, o funcionamento normal do organismo e na nutrição humana em geral (RIBEIRO; RIBEIRO, 2010). Os benefícios conferidos pelo leite de cabra estão associados ao baixo potencial alergênico (especula-se que tal efeito seja devido a menor quantidade de α 1-caseína); maior quantidade de triglicerídeos de cadeia média e curta, bem como, de ácido linoleico conjugado (CLA; do inglês “conjugated linoleic acid”) (importantes no tratamento de doenças, principalmente intestinais); habilidade de aumentar a disponibilidade de muitos nutrientes, como o ferro, atuando na prevenção da anemia; diminuição do colesterol, entre outros (KISKINI; DIFILIPPO, 2013; SILANIKOVE et al., 2010; HAENLEIN, 2004).

Uma classe de componentes do leite que vem sendo atualmente bastante estudado é a dos oligossacarídeos. Sabe-se que no leite humano existe uma concentração significativamente alta de oligossacarídeos (OS) quando comparado a outras espécies de ruminantes (MARTINEZ-FEREZ et al., 2006). Graças às suas complexas estruturas, os OS do leite humano possuem propriedades prebióticas e anti-inflamatórias, além de desempenhar papel importante no sistema imune de bebês, pois muitos desses OS não são digeridos e, portanto, são utilizados pela microbiota intestinal. Além disso, os OS também fornecem Sia para o bebê, importante nutriente potencialmente essencial para o desenvolvimento cerebral e cognição, como será discutido posteriormente (KISKINI; DIFILIPPO, 2013; OLIVEIRA et al., 2012b; SILANIKOVE et al., 2010).

Além do leite de cabra possuir maior quantidade de oligossacarídeos do que o leite de vaca e leite de ovelha (URASHIMA et al., 2013), possui também um perfil de Sia mais comparável ao do leite humano principalmente devido à presença predominante do isômero trissacarídeo 6'-sialil-lactose, em comparação a uma maior predominância do isômero 3'-sialil-lactose no leite bovino (VIVERGE et al., 1997). Especificamente, em uma recente revisão, Kiskini and Difilippo (2013) constataram que seis OS (do inglês, β 3'-galactosyllactose, β 6'-galactosyllactose, 2' fucosyllactose, lacto-N-hexaose, 6-N-acetylneuraminyllactose, 3'-N acetylneuraminyllactose) encontrados no leite de cabra também são encontrados no leite humano.

Alguns efeitos na saúde humana encontrados com a utilização de OS do leite humano também foram vistos com os OS do leite de cabra. Estudos *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2012b) e *in vivo* (LARA-VILLOSLADA et al., 2006; DADDAOUA et al., 2005) com OS do leite de cabra mostraram benefícios em relação a sua ação prebiótica e anti-inflamatória.

Uma característica que diferencia estruturalmente os OS do leite humano dos OS do leite de cabra e de outros ruminantes é a presença do tipo de Sia N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), pois a única forma de Sia encontrada no leite humano é o Neu5Ac (KISKINI; DIFILIPPO, 2013). Como nenhuma via alternativa para a síntese de Neu5GC foi encontrada no ser humano, deduz-se que a incorporação desse composto é feito através da alimentação (HEDLUND et al., 2007). Tal tipo de Sia e anticorpos anti-Neu5Gc tem sido encontrado em tumores e estão associados com várias doenças, como artrite reumatoide e aterosclerose (PADLER-KARAVANI et al., 2008; TANGVORANUNTAKUL et al., 2003). Pesquisas futuras são necessárias para avaliar o papel dos OS do leite de ruminantes no fornecimento e incorporação de Neu5GC nos tecidos e se há relação com alterações fisiológicas ou predisposição e desenvolvimento de doenças nos seres humanos, como inflamação crônica, aterosclerose, câncer, entre outras (KISKINI; DIFILIPPO, 2013; PADLER-KARAVANI et al., 2008).

Muitos aspectos podem modificar a composição do leite de cabra, como: clima, estágios de lactação, dieta, a raça do animal e o número de ordenhas (KISKINI; DIFILIPPO, 2013). Trabalho recente do nosso grupo (SOUSA et al., 2015) quantificou as concentrações de ácido siálico no leite de cabra em diferentes períodos de lactação, identificando o período de lactação que apresentou maior quantidade de Neu5Ac (estágio II = 105 dias). Essa quantificação fornece suporte para a fabricação de fórmulas infantis com perfil e quantidade de ácido siálico mais próximos à realidade do leite humano, pois, apesar dos OS do leite humano ser considerados únicos, o leite de cabra é uma fonte rica de OS com perfil

semelhante e pode ser adequado para suplementar fórmulas infantis (OLIVEIRA et al., 2012b).

A obtenção de OS a partir do leite de cabra pode ser cara, enquanto que obtê-los de subprodutos como o soro do leite durante a fabricação de queijo é uma alternativa mais econômica e, portanto, mais viável (OLIVEIRA et al., 2012b). O soro do leite é considerado um poluente, principalmente para rios e mares, devido à sua elevada demanda biológica de oxigênio (KAUR et al, 2009); e o descarte desse soro em esgotos municipais foi proibido por muitas autoridades locais, uma vez que interrompe o processo biológico de estações de tratamento de águas residuais (YADAV et al., 2015). Como a maioria dos OS do leite durante a produção de queijo vai para o soro (OLIVEIRA et al., 2012b) e como o soro de leite não pode ser diretamente descarregado para o meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2012a), a utilização do soro do leite de cabra para a recuperação dos OS torna-se interessante não apenas do ponto de vista econômico, mas também ecologicamente.

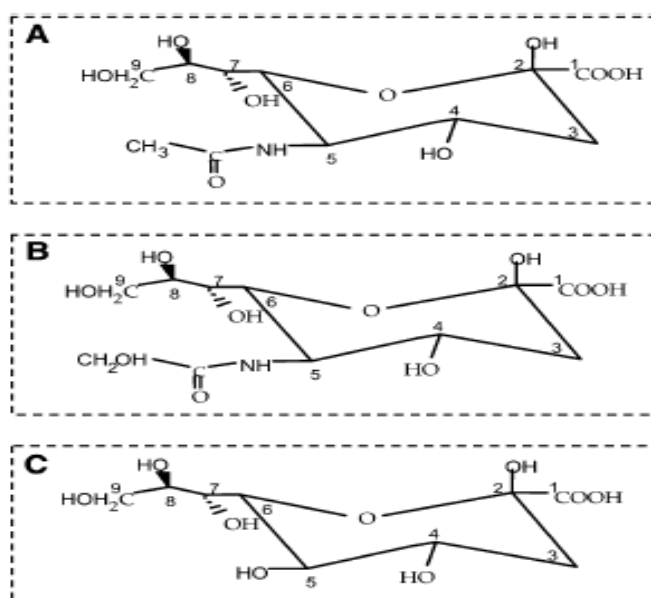
2.2 ÁCIDO SIÁLICO

O Ácido Siálico (Sia) compreende uma família de açúcares derivados do Ácido neuramínico composto por 9 carbonos. Os dois membros da família mais abundantes na natureza são o Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) e o N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). O membro recentemente descoberto é o KDN (do inglês, 2-keto-3-deoxy-nonulosonic acid, ketodeoxynonulosonic acid) encontrado em ovas de peixe e em baixos níveis em glóbulos vermelhos humanos normais (WANG, 2012).

O ser humano tem a capacidade de sintetizar apenas o Neu5Ac. Não é mais possível a síntese do Neu5Gc a partir do Neu5Ac, devido a uma mutação no gene responsável por converter a forma de N-acetil (Neu5Ac) em N-glicolil (Neu5Gc) [CHOU et al., 2002]. O Neu5Gc não é encontrado no homem, com exceção de baixos níveis detectados em carcinomas, tecido fetal e alguns tipos de tecidos normais como o epitélio e endotélio de amostras humanas (TANGVORANUNTAKUL et al., 2003). Foi visto que o Neu5Gc exógeno pode ser incorporado e metabolizado por culturas de células humanas por vias bioquímicas específicas (BARDOR et al., 2005), sugerindo que o Neu5Gc encontrado em tecidos humanos são de fontes dietéticas, como leite e carnes vermelhas (HEDLUND et al., 2007). O impacto em longo prazo da incorporação de Neu5Gc provenientes da dieta na saúde e na doença precisa ser determinado (CHEN et al., 2014). Apesar dos possíveis efeitos negativos, esse composto e seus anticorpos podem ser um método potencial para detectar risco, progressão ou respostas terapêuticas em doenças crônicas relacionadas à inflamação, como câncer e doenças cardiovasculares (PADLER-KARAVANI et al., 2013).

Resíduos de Neu5Ac estão presentes nos vertebrados, principalmente nas membranas celulares, participando de reconhecimento e interações entre células (SCHNAAR; GERARDY-SCHAHN; HILDEBRANDT, 2014). A grande parte do Neu5Ac está conjugada, na maioria dos tecidos em cadeias de oligossacarídeos de glicoproteínas. No Sistema nervoso, o Neu5Ac está predominantemente ligado a glicolipídios (WANG; BRAND-MILLE, 2003). Além dos tipos de Sia citados, o polímero de Neu5Ac com natureza polianiônica, conhecido como Ácido Polisiálico (PSA), também é encontrado nos seres humanos, principalmente conjugado à molécula de adesão celular neural (NCAM), conferindo a essa proteína propriedades importantes envolvidas com a plasticidade neural (RUTISHAUSER, 2008).

Figura 1. Estrutura molecular dos membros da família do Ácido Siálico.



A - Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). B - N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). C – KDN (do inglês, 2-keto-3-deoxy-nonulosonic acid, ketodeoxynonulosonic acid). Fonte: WANG, 2012.

O metabolismo do Ácido Siálico foi revisado por Reinke e colaboradores (2009). O Neu5Ac pode ser sintetizado a partir de frutose-6-fosfato (Frutose-6-P), da glicólise de componentes dietéticos ou da N-acetilglucosamina após a degradação de glicanos endógenos ou exógenos. A figura 2 resume a síntese do Neu5Ac (REINKE et al., 2009). Nos vertebrados e todos os mamíferos, com exceção dos seres humanos, o Neu5Ac pode ser convertido em Neu5Gc, por uma hidroxilase específica no retículo endoplasmático (REINKE et al., 2009).

As enzimas sialidases e sialiltransferases são responsáveis pela remoção e adição, respectivamente, de resíduos de Sia dos sialoconjugados e com isso, pela densidade de Sia encontrada em diferentes regiões de tecidos e células (LINNARTZ-GERLACH; MATHEWS; NEUMANN, 2014). Foram identificadas 4 tipos de sialidases (neuraminidases) nos mamíferos: NEU1 – predominantemente lisossomal, NEU2 - predominantemente citosólica, NEU3 - predominantemente na superfície celular associada à membrana e NEU4-predominantemente intracelular associada a membranas. Elas são expressas em diferentes regiões dos tecidos e células (MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012). Há vários tipos de sialiltransferases, que se diferenciam pelo tipo de ligação formada e estrutura para a qual o Sia será transferido (LINNARTZ-GERLACH; MATHEWS; NEUMANN, 2014). Duas sialiltransferases são bastante estudadas, ST8SiaII (polisialiltransferase II) e ST8SiaIV (polisialiltransferase IV), responsáveis pela biossíntese do PSA (SCHNAAR; GERARDY-SCHAHN; HILDEBRANDT, 2014; WANG, 2012; CLOSE; COLLEY, 1998).

A absorção do Sia derivado do leite tem sido bastante estudada. A hidrólise de carboidratos contendo ácido siálico no intestino é possível devido à atividade elevada da sialidase na mucosa, durante o período de aleitamento, em várias espécies e positivamente correlacionada com o teor de Sia dos respectivos leites maternos (DICKSON; MESSER, 1978). Foi analisada a absorção do Sia marcado radioativamente, o qual foi 90% absorvido, sendo 30% retido no corpo e 3-4% no cérebro após 6 horas da administração em ratos (NOBLE; SCHAUER, 1981). Porém, em humanos, Brand-Miller et al (1998) demonstraram que a maioria dos OS, inclusive os sialilados, resistem à digestão no intestino delgado e à fermentação no cólon de crianças. Na microbiota intestinal, o ácido siálico está envolvido na proteção contra infecções, impedindo a ligação do patógeno na mucosa intestinal através da própria ligação com bactérias, rotavírus e toxinas (IDOTA et al., 1995; VARKI, 1993; PARKKINEN et al., 1983).

Aproximadamente 88 diferentes oligossacarídeos do leite materno foram isolados e caracterizados; destes, cerca de 50% são sialilados (NEWBURG; NEUBAUER, 1995; CHATURVEDI et al, 1997; SHEN et al, 2000). Entre os oligossacarídeos sialilados do leite materno, os mais representativos são Sialillacto-N-tetraose c, 6'-sialillactose (6'-SL) e o Disialillacto-N-tetraose (COPPA et al, 1999). Todos os oligossacarídeos sialilados decrescem gradualmente durante a lactação (WANG; BRAND-MILLE, 2003). O ácido siálico parece ser uma das frações mais variáveis no leite humano, pois a sua quantidade no colostro (leite produzido 1-6 dias após o nascimento) é maior do que no leite de transição (7-10 dias após o nascimento) que, por sua vez, também é maior do que no leite produzido de 1 a 3 meses após o nascimento (WANG, et al., 2001a).

Todos os mamíferos tem a capacidade de sintetizar o ácido siálico em todos os tecidos a partir de açúcares precursores simples, como foi discutido acima. Duncan e colaboradores (2009) observaram que os perfis de expressão de genes que codificam algumas enzimas e transportadores envolvidos no metabolismo do Sia no cólon de ratos sugerem que o Sia é absorvido e catabolizado durante o período inicial da amamentação. Ao final do desmame, a síntese do Sia é favorecida, sugerindo que a absorção máxima de Neu5Ac ocorre quando este é fornecido através do leite para o filhote. Além disso, os autores sugerem que o cérebro pode depender de Neu5Ac sintetizado em outro órgão, pois frações de membrana de tecido cerebral contêm proporcionalmente mais Neu5Ac do que frações de membrana do fígado de ratos (GAGIANNIS et al., 2007). Postula-se que o bebê humano pode ter sua capacidade de

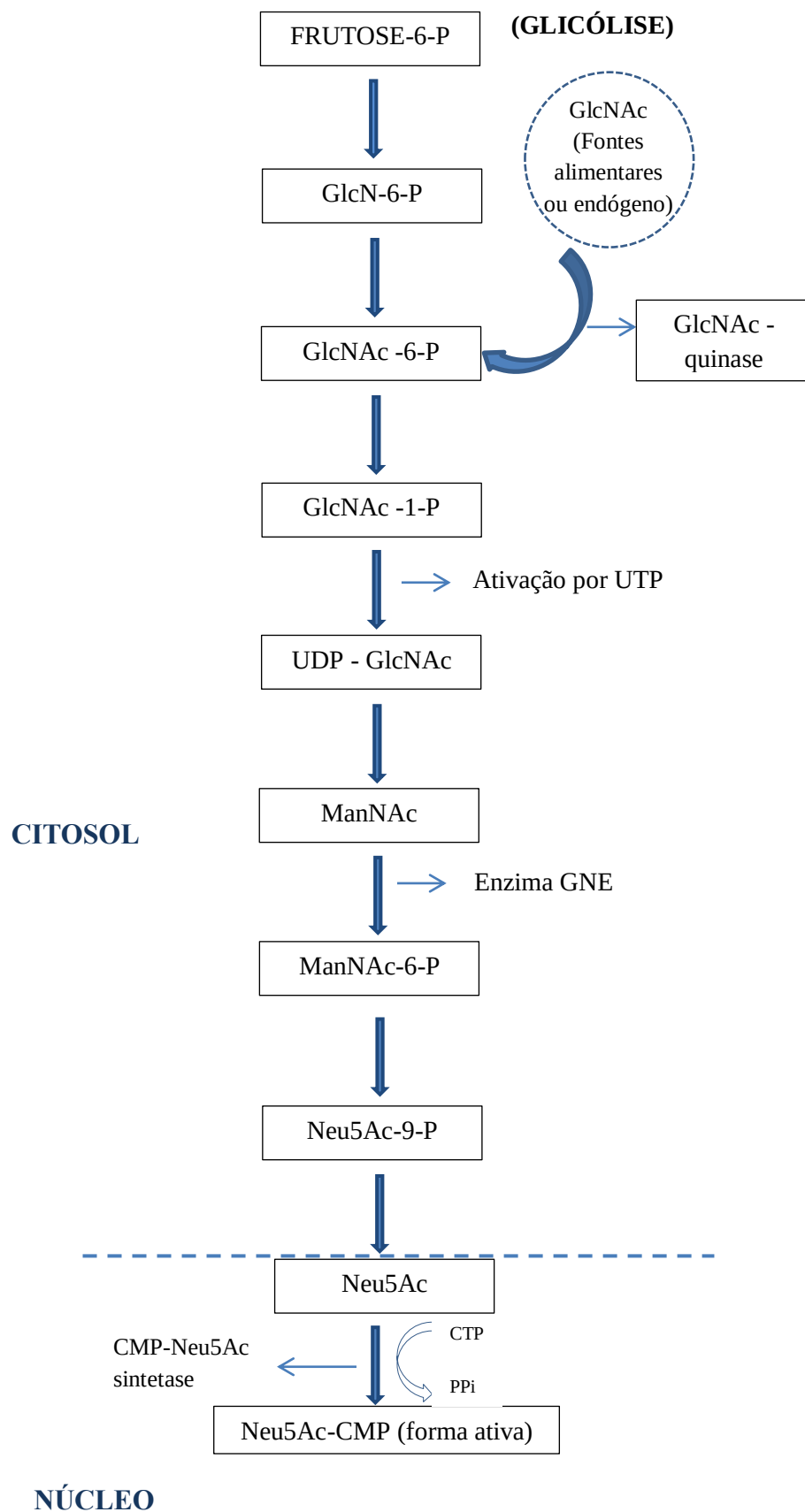


Figura 2. Síntese do Neu5Ac. Adaptada de Reinke et al., 2009.

UDP: Difosfato de uridina; UTP: Trifosfato de uridina; P: Fosfato; PPi: Pirofosfato inorgânico; ManNAc: N-acetilmanosamina; Neu5Ac: Ácido N-Acetilneuramínico; GlcN: Glucosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GNE: N-acetilmanosamina quinase; CTP: Citidina trifosfato; CMP: Citidina monofosfato.

sintetizar Neu5Ac limitada durante vida pós-natal precoce. (WANG et al, 2001a, b). Segundo Wang e Brand-Miller (2003), o Sia pode ser nutriente essencialmente condicional na infância, se a demanda supera a síntese endógena.

Quando o leite materno é insuficiente, os recém-nascidos necessitam receber alimentação por meio de fórmulas infantis à base de leite bovino, o qual possui menor quantidade de Neu5Ac do que o leite humano (CARLSON, 1985; SÁNCHEZ-DIAZ et al., 1997; WANG et al., 2001b). Além disso, no leite humano, a maioria do Neu5Ac está ligada a oligossacarídeos, enquanto que, no leite de vaca, está ligada a proteínas (WANG et al., 2001a). Tais diferenças de quantidade e qualidade podem estar relacionadas com a maior quantidade de Neu5Ac cerebral encontrada em bebês, que morreram de Síndrome da morte súbita infantil, amamentados com leite materno em comparação com bebês alimentados com fórmulas infantis (WANG et al., 2003).

2.2.1 Ácido siálico e função neural

Membranas das células neuronais dos mamíferos possuem a maior concentração de Sia comparado a outras membranas do corpo humano (WANG, 2012), em sua maioria como parte estrutural e funcional em gangliosídeos e glicoproteínas. Os primeiros são glicosfingolipídeos complexos, que contêm diferentes quantidades de carga negativas provenientes dos seus resíduos de ácido siálico. Esses resíduos constituem a parte hidrofílica dos gangliosídeos (WANG; BRAD-MILLER, 2003). A quantidade e distribuição de Neu5Ac dos gangliosídeos cerebrais mudam com o desenvolvimento (SVENNERHOLM et al., 1989). Os principais gangliosídeos encontrados no cérebro adulto humano são GM1, GD1a, GD1b e GT1b. Eles estão envolvidos, entre outras funções no sistema nervoso, com a interação mielina/axônio através da ligação com a lectina semelhante à imunoglobulina/glicoproteína associada à mielina (SINGLEC-4/MAG) [BAKHTI et al., 2013; COLLINS et al., 1997]. Wang e Brand-Mille (2003) propuseram mecanismos nos quais os gangliosídeos estariam envolvidos na formação de memória. Um desses mecanismos seria baseado em alterações na concentração sináptica de gangliosídeos, através de interações com proteínas de membrana. Além disso, postula-se influência na flexibilidade e fluidez da membrana, ligação com o íon cálcio, bem como, mudança da permeabilidade da membrana para o cálcio, controle da concentração do cálcio extracelular e influência na excitabilidade neuronal.

O Ácido Polisiálico (PSA) é principalmente encontrado ligado à molécula de adesão celular neuronal (NCAM), apesar de haver evidências que canais de sódio dependente de voltagem, neurofilina, molécula de adesão celular sináptica 1, entre outras moléculas, possuam níveis detectáveis de polisialilação (WANG, 2012; RUTISHAUSER, 2008). Postula-se que a redução da afinidade homofílica da NCAM conferida pelo PSA seja devido à repulsa estérica causada pelas cargas negativas e grau de hidratação do PSA; portanto, o nível de polisialilação da membrana celular é um fator importante para as interações membrana-membrana (RUTISHAUSER, 2008). A PSA-NCAM é uma proteína que atende aos critérios de uma molécula estar envolvida na indução da plasticidade estrutural cerebral (FRYER; HOCKFIELD, 1996), sendo considerada fundamental para o mecanismo de formação da memória. Mudanças no estado de polisialilação da NCAM ocorrem durante a migração celular de neuritos, sinaptogênese (TANG; RUTISHAUSER; LANDMESSER, 1994; NAKAYAMA et al., 1998) e aprendizagem em ratos (CREMER et al., 1994; REGAN; FOX, 1995), além de a PSA-NCAM estar expressa em regiões do SNC dos adultos com capacidade de formação de novos arranjos estruturais, como no giro denteado do hipocampo e bulbo olfatório (FRYER; HOCKFIELD, 1996). O PSA está envolvido em vários processos importantes no SNC: migração de progenitores neuronais, transição de migração celular para diferenciação, modulação da função da neurotrofina, início do período crítico da plasticidade do sistema visual e mielinização dos axônios do SNC (RUTISHAUSER, 2008); sendo, portanto, essencial para o desenvolvimento e manutenção do SNC dos vertebrados.

Pesquisas com modelos experimentais têm avaliado os benefícios do ácido siálico. Em estudo pioneiro, Carlson e House (1986) observaram uma maior concentração de ácido siálico nos gangliosídeos cerebrais e cerebelares em ratos administrados com Neu5Ac por via oral e intraperitoneal, em comparação com um grupo controle. Morgan e Winick (1980) avaliaram o efeito da administração de Neu5Ac por via intraperitoneal e também observaram maior incorporação do Neu5Ac nos gangliosídeos e glicoproteínas nos grupos tratados. Estudo mais recente (SCHOLTZ et al., 2013) confirmou os achados anteriores demonstrando que o Neu5Ac dietético aumenta o conteúdo de Neu5Ac nos gangliosídeos corticais de um modo dependente da dose, quando os animais são alimentados durante um período de rápido desenvolvimento cerebral.

Assim como em avaliações neuroquímicas, aspectos comportamentais também foram avaliados. Na mesma pesquisa de Morgan e Winick (1980), ratos tratados na vida precoce com ácido siálico apresentaram melhores desempenhos em teste comportamental (labirinto Y), e a melhora na *performance* permaneceu na vida adulta. Tais benefícios foram observados

tanto em ratos nutridos como em ratos desnutridos. Wang e colaboradores (2007) também avaliaram os efeitos do ácido siálico, só que dessa vez em diferentes concentrações provenientes de Glicomacropeptídeos de caseína (CGMP) adicionados na dieta de porcos. Eles observaram maior concentração de ácido siálico em glicoproteínas no córtex frontal nos grupos tratados e também demonstraram desempenho superior tanto em teste de aprendizagem (labirinto com 8 braços) como de memória (reconhecimento visual).

Além da administração de ácido siálico, sua ausência também foi avaliada através da manipulação de mutações genéticas. Recentemente, Yoo et al. (2015) demonstraram que mutações em ratos em genes responsáveis pela sialilação de gangliosídeos e algumas glicoproteínas acarretaram em desmielinização expressiva, bem como retardo no crescimento, prejuízos na coordenação motora, distúrbios no andar, comportamento ansioso e profunda deficiência cognitiva. Prolo, Vogel e Reimer (2009) haviam também demonstrado que o transportador lisossomal de Sia, Sialina, é necessário para a mielinização normal no SNC, enfatizando a importância do Sia no processo de mielinização.

Outro papel importante do Sia no SNC é observado na interação entre neurônios e células da glia, principalmente com as micróglia - células imunitárias inatas residentes do SNC - pela ligação do Sia com receptores SIGLECS (LINNARTZ-GERLACH; MATHEWS; NEUMANN, 2014). A remoção do Sia, através da aplicação de neuraminidase em culturas de células-tronco embrionárias derivadas de micróglia, alterou a morfologia da micróglia, reduziu a densidade de neuritos, o número de corpos celulares neuronais e a ligação da proteína SIGLEC-F (encontrada nas células microgliais) comparado a culturas controles (WIELGAT; BRASZKO, 2012). Com isso, há evidências de que a interação entre o Sia e os SIGLECS pode proteger a integridade neuronal durante processos neurodegenerativos (WIELGAT; BRASZKO, 2012).

Há uma supressão cerebral específica de Neu5Gc comum a todos os mamíferos, pois, como foi discutido acima, o Neu5Gc não é sintetizado pelos seres humanos. Recentemente, Taguchi e colaboradores (2015) avaliaram a cinética do Neu5Gc *in vivo* e encontraram maior acumulação de Neu5Gc do que Neu5Ac no cérebro e no hipocampo de ratos após uma injeção intravenosa dos dois compostos radioativos. Esse resultado torna pertinente a preocupação em relação à possível toxicidade causada pelo Neu5Gc, pois o Sia desempenha papéis importantes na excitabilidade neuronal, maturação e alongação axonal, aprendizagem e memória, como será analisado mais adiante e no artigo científico com os resultados desta dissertação.

2.2.2 Ácido siálico e excitabilidade do sistema nervoso

O ácido siálico tem sido extensivamente estudado em relação à sua contribuição para a excitabilidade do SNC e desordens neurológicas associadas, como a epilepsia. Por exemplo, ratos tornados epiléticos pelo método do abrasamento apresentam alterações na atividade da enzima neuraminidase em regiões diferentes do SNC (BOYZO et al., 2003). Como o ácido siálico está envolvido em interações entre células e a epilepsia altera conectividade e interações celulares, é plausível propor que o Sia afeta a excitabilidade no SNC (BOYZO et al., 2003) e está envolvido com esse distúrbio. A Sialidose, um transtorno raro, tem como sintomas retardo mental e convulsões (LAI et al., 2009; ZUPANC; LEGROS, 2004). Esse transtorno é causado por uma mutação no gene NEU1 que leva a uma deficiência da atividade de neuraminidase e, portanto, é caracterizado pela acumulação tecidual de oligossacarídeos sialilados, além de ser considerado um dos erros inatos do metabolismo que pode causar epilepsia mioclônica progressiva (SEDEL et al., 2007).

Os canais de sódio voltagem-dependentes são essenciais para a excitabilidade neuronal e seu papel no início e propagação do potencial de ação é bem estabelecido (JOHNSON et al., 2004). Uma prova disso é a relação entre a mutação em alguns tipos desse canal e convulsões severas em crianças (SAITOH ET AL., 2015). Tem sido constatado que canais de sódio no cérebro têm um significativo conteúdo de resíduos de Sia e que esse composto pode modular a função desse canal (ISAEV et al., 2007; JOHNSON et al., 2004). A remoção do Sia enzimaticamente altera as funções do canal de sódio voltagem-dependente (ISAEV et al., 2007; TYRRELL et al., 2001 e RECIO-PINTO et al., 1990) e muitos autores atribuem esse efeito à presença de cargas negativas provenientes dos resíduos de Sia sobre a região de superfície extracelular do canal (SAVRASOVA, et al., 2010; ISAEV et al., 2007; JOHNSON et al., 2004). Isaev e colaboradores (2007) observaram que o tratamento com a neuraminidase (NEU) reduziu a sensibilidade do canal de sódio e do limiar do potencial de ação para o cálcio celular. Tal efeito pode ser a causa da poderosa ação anticonvulsivante exercida pela NEU em modelos de epilepsia *in vitro* e *in vivo*. O bloqueador de NEU, conhecido como NADNA (do inglês, N-Acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid), em contraste, reduziu significativamente o limiar de convulsão e agravou as convulsões no hipocampo. Um estudo com diferentes modelos de epilepsia demonstrou que o tratamento com a NEU reduziu os picos intercríticos no hipocampo de ratos (ISAEV et al., 2011), e outro, utilizando modelo de atividade semelhante à convulsão em fatias do hipocampo de ratos, constatou que o

tratamento com o bloqueador de NEU endógeno aumentou a duração de oscilações síncronas em comparação às fatias não tratadas (SAVRASOVA, et al., 2010). Tais achados suportam o interesse crescente no controle das cargas superficiais extracelulares, principalmente na região do hipocampo, como uma abordagem terapêutica para o tratamento de epilepsia (ISAEV et al., 2007).

Outra demonstração da contribuição do ácido siálico à excitabilidade do sistema nervoso foi também observada em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos que sofreram lesão do nervo periférico. Após a lesão de constrição crônica, há um aumento da excitabilidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal (PENG et al., 2004) e da velocidade eletroforética (LI et al., 2015), porém, após o tratamento com a NEU, a excitabilidade (PENG et al., 2004) e a velocidade eletroforética (LI et al., 2015) foram reduzidas substancialmente. Os autores também atribuem o resultado encontrado à presença de cargas negativas ao redor de proteínas transmembranares, como os canais voltagem-dependentes, após a injúria.

O aumento da atividade neuronal causado pelo Sia também foi objeto de estudo para avaliar fenômenos relacionados à aprendizagem e memória, e, portanto, plasticidade. Um exemplo disso é a Potenciação de longa duração (LTP) que consiste em um aumento de longa duração da força sináptica após uma estimulação tetânica de alta frequência (COOKE; BLISS, 2006). Fatias de hipocampus de ratos tratadas com o bloqueador de neuraminidase (NADNA) sofreram uma diminuição da magnitude da LTP. Como a indução da LTP é mais difícil em vias sinápticas com uma história de aumento da atividade, o aumento provável de Sia na região hipocampal através do bloqueio da NEU pode ter causado esse aumento da excitabilidade nas vias sinápticas que implicou na redução da magnitude da LTP (SAVOTCHENKO et al., 2015). Foi visto também que ratos que foram tratados com uma injeção local no hipocampo de endo-NEU tiveram prejuízos na memória espacial, bem como, supressão da LTP em fatias do hipocampo (BECKER et al., 1996).

2.3 DESNUTRIÇÃO E FUNÇÃO NEURAL

A desnutrição é um problema abrangente que afeta milhões de seres humanos, durante o período de maior vulnerabilidade do sistema nervoso (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002), seja na vida fetal, seja como recém-nascidos e crianças. O aporte inadequado nutricional continua sendo um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento cerebral (ALAMY, BENGELLOUN, 2012). Como o desenvolvimento do cérebro é tempo-dependente (MORGAN, 1990; UAUY; MENA; PEIRANO, 2001), uma vez que a sequência de eventos de crescimento ocorrer, não poderá ser reiniciada, o que pode ter grande impacto sobre a função cognitiva na idade adulta. Por conseguinte, a nutrição ideal é fundamental para apoiar o crescimento neural até o cérebro atingir o seu potencial máximo de desenvolvimento (WANG, 2012).

A desnutrição em humanos parece estar associada com dificuldade de aprendizagem e distúrbios cognitivos (ROOIJ et al., 2010). Apesar das limitações dos modelos animais para o estudo do desenvolvimento do SNC humano, todos os mamíferos tem sequência temporal similar dos processos de neurogênese e gliogênese (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Morgane e colaboradores (2002) em uma revisão propõem curvas de velocidade comparando a duração e o período de processos específicos do desenvolvimento do SNC de ratos e humanos, tornando úteis e viáveis comparações entre as duas espécies. Estudos experimentais em animais são imprescindíveis para a compreensão de como a desnutrição afeta o desenvolvimento cerebral em humanos, especialmente em crianças que são as mais atingidas (ALAMY, BENGELLOUN, 2012).

Existem duas definições principais de desnutrição bastante utilizadas na literatura. Do inglês, “Malnutrition” implica na desnutrição causada pelo excesso, pela falta ou diminuição de um ou mais nutriente específico, como é o caso da proteína. Do inglês, “Undernutrition” corresponde à forma de desnutrição na qual todos os nutrientes necessários estão disponíveis, porém em quantidades insuficientes (MORGANE; MOKLERA; GALLER, 2002). Em modelos animais, a desnutrição, nas suas diferentes formas, pode ser produzida por métodos distintos, como: dietas com baixo teor de proteína, quantidade insuficiente de alimentos de boa qualidade, competição dos filhotes pelo leite materno quando são amamentados em grandes ninhadas, remoção dos filhotes das ninhadas (mantido metade do dia com fêmeas não-lactantes ou em uma incubadora) e cauterização de alguns mamilos da mãe, reduzindo assim a oferta do leite (CRNIC, 1980).

Várias pesquisas mostraram que a desnutrição, seja pré-natal ou pós-natal, causa prejuízos na aprendizagem e memória e distúrbios cognitivos e comportamentais. Estudos mostraram que animais que sofreram desnutrição apresentaram alterações no comportamento defensivo (HERNANDES et al., 2005) e comportamento ansioso (FRANÇOLIN-SILVA et al., 2006), hiperatividade, aumento da reatividade sensorial e do comportamento exploratório (ALAMY et al., 2005), além de prejuízos na aprendizagem e memória de retenção (FUKUDA; SILVA; ALMEIDA, 2002). Ratos e humanos submetidos à desnutrição precoce apresentaram déficits na função cognitiva também na idade adulta (MCGAUGHY et al., 2014; ROOIJ et al., 2010).

Há evidências de que os efeitos do suporte nutricional inadequado no desenvolvimento cerebral são duradouros e acarretam déficits permanentes de aprendizagem e memória (GALLER, 2001; ROOIJ et al., 2010), principalmente por ocorrer no chamado “período crítico de desenvolvimento” ou “período de crescimento rápido do cérebro”. No homem esse período compreende o terceiro trimestre gestacional e segue até os primeiros dois a quatro anos de vida, enquanto que no rato esse período equivale às três primeiras semanas de vida pós-natal, coincidindo com o período de aleitamento (MORGANE et al., 1993).

Os prejuízos causados pela desnutrição podem ser consequência de alterações na estrutura e função do hipocampo (MORGANE; MOKLERA; GALLER, 2002; LISTER et al., 2011), do córtex pré-frontal (AMARAL et al., 2015), alterações nos sistemas GABAérgico e serotoninérgico (ALAMY, BENGELLOUN, 2012), no metabolismo do glutamato (DÍAZ-CINTRA et al., 2007; FEOLI et al., 2006), no processo de mielinização, sinaptogênese e gliogênese (MORGANE et al., 1978; 1993), além de diminuição na plasticidade do SNC como um todo (BRONZINO et al., 1997). Todas essas alterações podem estar também envolvidas com a menor reatividade de animais desnutridos a determinadas drogas e esse achado pode auxiliar em novas descobertas acerca dos mecanismos subjacentes à desnutrição no SNC em humanos (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996).

Com relação às alterações do Sia na desnutrição, Morgan e Winick (1980) constataram que ratos que sofreram desnutrição protéica pré-natal tiveram a incorporação cerebral de Neu5Ac menor e mais lenta do que ratos nutridos, demonstrando que o período de máxima incorporação de Neu5Ac era retardado no grupo desnutrido.

Há controvérsias na literatura quanto a qual tipo de desnutrição é mais severa. Morgane e colaboradores (2002) relatam que a desnutrição protéica parece ser mais crítica. Porém, Alamy e Bengelloun (2012) concluíram que independente da manipulação dietética ou da desnutrição ser calórica ou protéica, os efeitos neuroanatômicos, neuroquímicos e

neurocomportamentais são similares. Dependendo do período, da duração e da severidade da desnutrição, as consequências serão distintas, reversíveis (MALTA et al., 2015) ou não (MORGANE et al., 1993). Portanto, é de extrema importância a investigação minuciosa e complexa das causas e consequências dessa condição desfavorável de nutrição, com o intuito de prevenir o desenvolvimento cerebral inadequado e prejuízos cognitivos nos períodos pré e pós-natal, estágios críticos no qual os processos organizacionais são mais facilmente modificados ou interrompidos.

2.5 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A DAC foi descoberta pelo neurocientista brasileiro Aristides Leão, quando realizava estudos sobre “epilepsia experimental” na superfície do córtex cerebral de coelhos anestesiados. O fenômeno consiste em uma diminuição da atividade elétrica cortical, que se propaga concentricamente, em resposta à estimulação química, elétrica ou mecânica de um ponto do tecido cortical e está relacionado com a excitabilidade do cérebro. Essa diminuição da atividade elétrica dura alguns minutos e se propaga lentamente (velocidades da ordem de poucos mm/min) por todo o córtex. À medida que o fenômeno se alastra para regiões corticais cada vez mais distantes do ponto onde se originou, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir do ponto inicialmente deprimido, também de forma concêntrica e ao final de cerca de 10 a 15 minutos todo o tecido se encontra recuperado (LEÃO, 1944a).

Durante a DAC, concomitantemente à depressão da atividade elétrica espontânea, é observada uma variação lenta de voltagem (VLV) na região cortical na qual o fenômeno está ocorrendo. O córtex se torna negativo em relação a um ponto de voltagem fixa. Essa variação negativa, de amplitude entre 5 e 20mV, é geralmente seguida e ocasionalmente precedida de uma fase positiva de menor amplitude (LEÃO, 1951). Subjacente a essa despolarização, há mudanças na distribuição de íons entre os meios intra e extra celulares. H^+ e K^+ saem das células, enquanto Na^+ , Ca^{++} e Cl^- entram na célula juntamente com a água, causando um aumento do volume celular e diminuição do espaço extracelular (GORJI, 2001). Além disso, ocorrem várias outras alterações, como dilatação dos vasos sanguíneos da pia-máter (LEÃO, 1944b), alterações das concentrações extracelulares de certos aminoácidos como taurina e glutamato (SCHELLER et al., 2000), aumento da utilização de glicose e consumo de O_2 (MIES; PASCHEN, 1984), dentre outros. Todas essas modificações são reversíveis (Figura 3).

Os aspectos-chave que caracterizam o fenômeno da DAC foram assim sumarizados (GUEDES, 2011): (1) é um fenômeno cooperativo, pois precisa de uma população mínima de corpos celulares para ser gerado; (2) necessita de algum tipo – qualquer tipo - de variação brusca de energia (estímulo) para ser deflagrado; (3) é reversível; (4) propaga-se igualmente de uma área sensorial para uma motora e vice-versa; (5) foi observado em todas as espécies de vertebrados até hoje estudadas, desde peixes até o homem; (6) é de propagação lenta em um tecido no qual o potencial de ação (PA) se propaga rapidamente; (7) propaga-se mais facilmente em cérebros lisencéfalos do que em giroencéfalos; e (8) não se sabe se é um fenômeno essencialmente fisiológico ou se também pode ser patológico, pois algumas

evidências sugerem que os mecanismos subjacentes à DAC seriam comuns aos de algumas doenças neurológicas. A DAC tem sido estudada como fenômeno potencialmente relevante para o melhor conhecimento dos mecanismos de doenças neurológicas humanas importantes, como as epilepsias, a enxaqueca com aura e a isquemia cerebral (NYE; THADANI, 2015; VINOGRADOVA, 2014; GORJI, 2001).

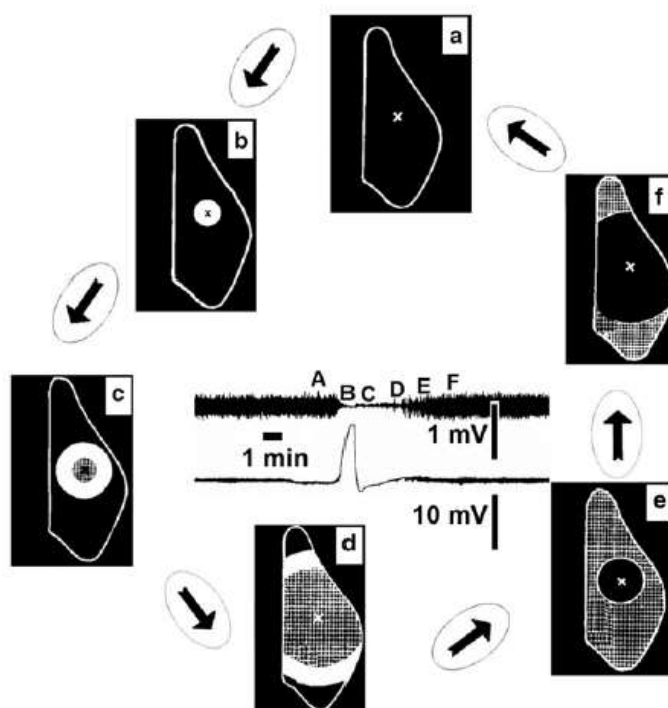


Figura 3. Esquema da sequência temporal cíclica de eventos da depressão alastrante cortical (DAC; adaptado de GUEDES, 2011). Em “a”, um córtex normal e nele um ponto (x) é estimulado, iniciando a DAC. Na sequência, indicada pelas setas, “b” a “d”, a propagação concêntrica do fenômeno da DAC está ilustrada. As áreas em branco representam porções do tecido cortical invadidas pelo fenômeno em tempos sucessivos. As áreas quadriculadas, “c” a “f” indicam regiões que sofreram a DAC e agora estão se recuperando (áreas refratárias a uma nova estimulação). De “b” a “f”, observa-se que propagação (área branca) e recuperação (área escura) dão-se de forma concêntrica, sendo o ponto inicialmente estimulado o primeiro a se recuperar totalmente. Finalmente em “a” todo o tecido se mostra completamente recuperado, retornando à condição inicial. No centro da figura, um traçado de registro demonstrando o eletrocorticograma (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV), a qual sempre aparece durante a DAC, quando o ECoG diminui sua amplitude. As letras “A” a “F” correspondem a sequência das etapas representadas nos desenhos externos.

O fenômeno da DAC vem sendo utilizado pelo nosso grupo como modelo experimental para avaliar o funcionamento do tecido neural e tem-se demonstrado que algumas condições nutricionais, hormonais, ambientais e farmacológicas podem modificar a

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

Tabela 1. Algumas condições que facilitam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor, Ano
Redução do cloreto extracelular	GUEDES e DO CARMO, 1980
Diazepam	GUEDES et al., 1992
Deficiência nutricional pela DBR*	ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997
Hipoglicemia	COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001
Privação do sono paradoxal	VASCONCELOS et al., 2004
Condição desfavorável de lactação	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Etanol (crônico)	ABADIE-GUEDES et al., 2008;
Arginina durante o desenvolvimento	MAIA et al., 2009
Hipertermia ambiental	FARIAS-SANTOS et al., 2009
Glutamina durante o desenvolvimento	LIMA et al., 2009
Uso de dipirona no início da vida	AMARAL et al., 2009
Lipídeos do leite de cabra adicionados à dieta materna	SOARES et al., 2012
Tratamento crônico com ácido ascórbico (60 ou 120 mg/Kg/d)	MONTE-GUEDES et al., 2011; MENDES-DA-SILVA et al., 2014
Tratamento com o antagonista serotoninérgico Tianeptina	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2013
Tratamento com glutamato monossódico	LIMA et al., 2013
Dexametasona	LOPES-DE-MORAIS et al., 2014

*Dieta Básica Regional

Tabela 2. Algumas condições que dificultam a propagação da DAC

Condição experimental	Autor/Ano
Tratamento dietético com lítio	GUEDES et al., 1989
Hiperglicemia	XIMENES-DA-SILVA e GUEDES, 1991 COSTA-CRUZ et al., 2006;
Anestésicos	GUEDES e BARRETO, 1992
Hipotireoidismo	GUEDES e PEREIRA-DA-SILVA, 1993
Envelhecimento	GUEDES et al., 1996
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	COSTA-CRUZ et al., 2006
Estimulação ambiental	SANTOS-MONTEIRO et al., 2000
Ativação do sistema serotoninérgico	AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006
Condições favoráveis de aleitamento	ROCHA-DE-MELO et al., 2006
Pilocarpina (doses subconvulsivantes)	GUEDES e VASCONCELOS et al., 2008
Tratamento de ratos adultos com triptofano (precursor da serotonina)	TRINDADE-FILHO et al., 2009
Deficiência, na dieta, de ácidos graxos essenciais	BORBA et al., 2010
Abolição da função ovariana (castração) no início da vida	ACCIOLY et al., 2012
Dieta hiperlipídica	GERMANO et al., 2013
Tratamento com o antagonista de opioides Naloxona	GUEDES et al., 2013
Tratamento crônico com 30mg/Kg/d de ácido ascórbico	MENDES-DA-SILVA et al., 2014
Tratamento com taurina	FRANCISCO e GUEDES, 2015

A desnutrição, seja por manipulação da dieta ou do tamanho da ninhada, facilita a propagação da DAC (MENDES-DA-SILVA et al., 2014; GUEDES et al., 2013; LIMA et al., 2009; ROCHA-DE-MELO et al., 2006; ROCHA-DE-MELO e GUEDES, 1997). Em animais com o estado nutricional comprometido, algumas substâncias alteram a DAC mais intensamente do que o fazem em animais bem-nutridos (FRANCISCO; GUEDES, 2015; AMARAL et al. 2009; DE AGUIAR et al. 2011, VASCONCELOS et al., 2004) e outras

afetam a DAC de forma menos intensa em animais desnutridos do que em bem-nutridos (GUEDES et al. 2013; AMÂNCIO-SANTOS et al. 2013; FRAZÃO et al., 2008; COSTA CRUZ; GUEDES 2001; GUEDES et al., 1992). Outros compostos influenciam a DAC de forma semelhante em animais nutridos e desnutridos (LIMA et al. 2009; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006; GUEDES et al., 2002). Esses achados podem estar relacionados à diferente reatividade de animais que sofreram desnutrição a determinadas drogas (ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996).

Com relação a produtos derivados do leite de cabra, foi visto que a dieta materna, fornecida durante apenas o período de lactação ou durante a gestação e lactação, contendo CLA proveniente do leite de cabra facilitou a propagação da DAC em filhotes de ratos (SOARES et al., 2012).

3 HIPÓTESE

A administração precoce do soro de leite de cabra e Neu5Ac facilita a propagação da DAC e melhora o desempenho dos animais em testes que avaliam o comportamento de memória. Esses efeitos são intensificados em animais amamentados em condições desfavoráveis de lactação (grandes ninhadas).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração oral do soro do leite de cabra e do Ácido N-acetilneuramínico sobre a DAC e a memória em ratos, tendo como modelo animal o rato nutrido e desnutrido.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ratos com 35-45 dias de idade, previamente desnutridos ou não, tratados (durante a lactação) com o soro do leite de cabra ou o Ácido N-acetilneuramínico sintético:

- Avaliar a evolução ponderal, como indicador de efeitos sobre o desenvolvimento corporal;
- Determinar as características de incidência e propagação do fenômeno da “depressão alastrante cortical” (DAC), como indicador de efeitos eletrofisiológicos cerebrais;
- Avaliar o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos, como indicador de memória;
- Comparar os efeitos eletrofisiológicos e comportamentais do soro de leite de cabra e do Ácido N-acetilneuramínico sintético em animais nutridos e desnutridos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁCIDO N-ACETILNEURAMÍNICO

O Ácido N-Acetilneuramínico utilizado foi obtido da Sigma Aldrich® com 95% de pureza.

5.2 SORO DO LEITE DE CABRA EM PÓ

O leite caprino *in natura* para a obtenção do soro foi obtido do Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias (CCHSA), Campus III/UFPB. Os animais, mantidos em sistema intensivo, alocados em galpão coberto, receberam ração completa composta de concentrado, feno de tifton e palma forrageira. As dietas foram calculadas segundo o National Research Council (NRC) - Nutrient requirements of small ruminants (2007) para atender a demanda de produção, considerando um teor de gordura de 4%. O leite caprino foi submetido à pasteurização lenta (65° C por 30 minutos).

O soro caprino foi gerado durante a produção do queijo tipo coalho que foi realizada através do uso de coagulação enzimática, de acordo com procedimento adaptado por Garcia et al. (2012). A água do soro foi posteriormente retirada com a utilização de um Mini Spray Dryer (modelo B290 Advanced, BUCHI) para a obtenção do soro em pó.

Após a obtenção do soro seco, procedeu-se à realização das análises físico-químicas: Umidade (base seca); Resíduo Mineral Fixo (RMF); Gordura (lactobutirômetro de Gerber); Proteína bruta pelo método de Micro-Kjedahl; Lactose por redução de Fehling; Acidez (em ácido láctico), e pH, conforme as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemistry (2005). O preparo da solução e quantificação de ácido siálico no soro de leite foram realizados seguindo a metodologia utilizada por Sousa et al (2015).

Na tabela 3 é apresentada a composição físico-química, destacando-se a quantidade total e das frações de ácido siálico do soro do leite caprino em pó.

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão da composição físico-química do soro do leite caprino em pó*.

Variáveis	Médias $\pm$ desvio-padrão **
Umidade (g/100g)	12,16 $\pm$ 0,69
Proteína (g/100g)	5,96 $\pm$ 0,30
Gordura (g/100g)	2,56 $\pm$ 0,25
Lactose % (m/m)	31,16 $\pm$ 1,58
RMF (g/100g)	2,23 $\pm$ 0,11
Acidez Titulável	0,46 $\pm$ 0,03
pH	6,6-7,2
Acido Siálico (mg/100g)	306,56 $\pm$ 10,77
NeuAc (mg/100g)	114,61 $\pm$ 7,08
NeuGc (mg/100g)	191,95 $\pm$ 3,68

*Dados não publicados de Araújo e colaboradores – com permissão dos autores

**Valores médios das determinações realizadas em triplicata.

NeuAc = Ácido N-acetilneuramínico; NeuGc = Ácido N-glicolilneuramínico

5.3 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os filhotes que foram tratados com o Ácido N-Acetilneuramínico e com o soro do leite de cabra provieram de ratas *Wistar*, do Biotério do Departamento de Nutrição da 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 da UFPE (Processo nº 23076.041458/2014-44 – ANEXO A). Após confirmação da fecundação através do esfregaço vaginal, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais de polipropileno. Os filhotes, após o desmame, também foram mantidos em gaiolas de polipropileno, à temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas (início da fase clara às 6:00 h) e com livre acesso à ração e água.

No início do aleitamento, os filhotes de várias mães foram reunidos e distribuídos aleatoriamente para constituir os dois seguintes grandes grupos, nutricionalmente distintos, segundo a técnica de manipulação do tamanho das ninhadas (FRANCISCO; GUEDES, 2015):

1) Grupo nutrido (L_9), no qual os filhotes foram amamentados em ninhadas de tamanho normal, formadas por 9 filhotes;

2) Grupo desnutrido (L_{15}), no qual os filhotes foram amamentados em ninhadas de tamanho grande, formadas por 15 filhotes. Esse procedimento induz deficiência nutricional nos filhotes durante esse período de rápido desenvolvimento cerebral (FRANCISCO; GUEDES, 2015).

Cada um dos dois grandes grupos nutricionalmente distintos foi dividido em 5 grupos:

- Grupo 1- (Nv): “naïve” (ou ingênuo); não receberam qualquer tratamento.
- Grupo 2- (Sal): tratados com 0,5 ml de solução salina (veículo) via sonda orogástrica, do sétimo até o décimo quarto dia de vida pós-natal (P7 – P14).
- Grupo 3- (SORO): tratados via sonda orogástrica com aproximadamente 17,45 g de soro do leite de cabra em pó/Kg peso corporal, diariamente, de P7 a P14. Essa quantidade, diluída em 0,5 ml de solução salina, correspondia à dose de 20 mg de Ácido N-acetilneuramínico/Kg peso corporal (CARLSON; HOUSE, 1986).
- Grupo 4- (AS20): tratado com 20 mg/Kg peso corporal de Ácido N-acetilneuramínico dissolvido em 0,5 ml de solução salina via sonda orogástrica, diariamente, de P7 a P14 (CARLSON; HOUSE, 1986).
- Grupo 5- (AS100): tratado com 100 mg/Kg peso corporal de Ácido N-acetilneuramínico, dissolvido em 0,5 ml de solução salina via sonda orogástrica, diariamente, de P7 a P14.

A combinação dos 2 estados nutricionais com as 5 condições de tratamento originaram os 10 grupos deste trabalho, como mostrado na Figura 4. Após o desmame (21 dias), os filhotes passaram a receber a dieta padrão do biotério (PRESENCE-Purina do Brasil Ltda; com 23% de proteína). Os animais quando atingiram a idade de 28 dias (P28) passaram pela avaliação comportamental e, posteriormente, dos dias 35 a 45 de idade, foi realizado o registro da DAC.

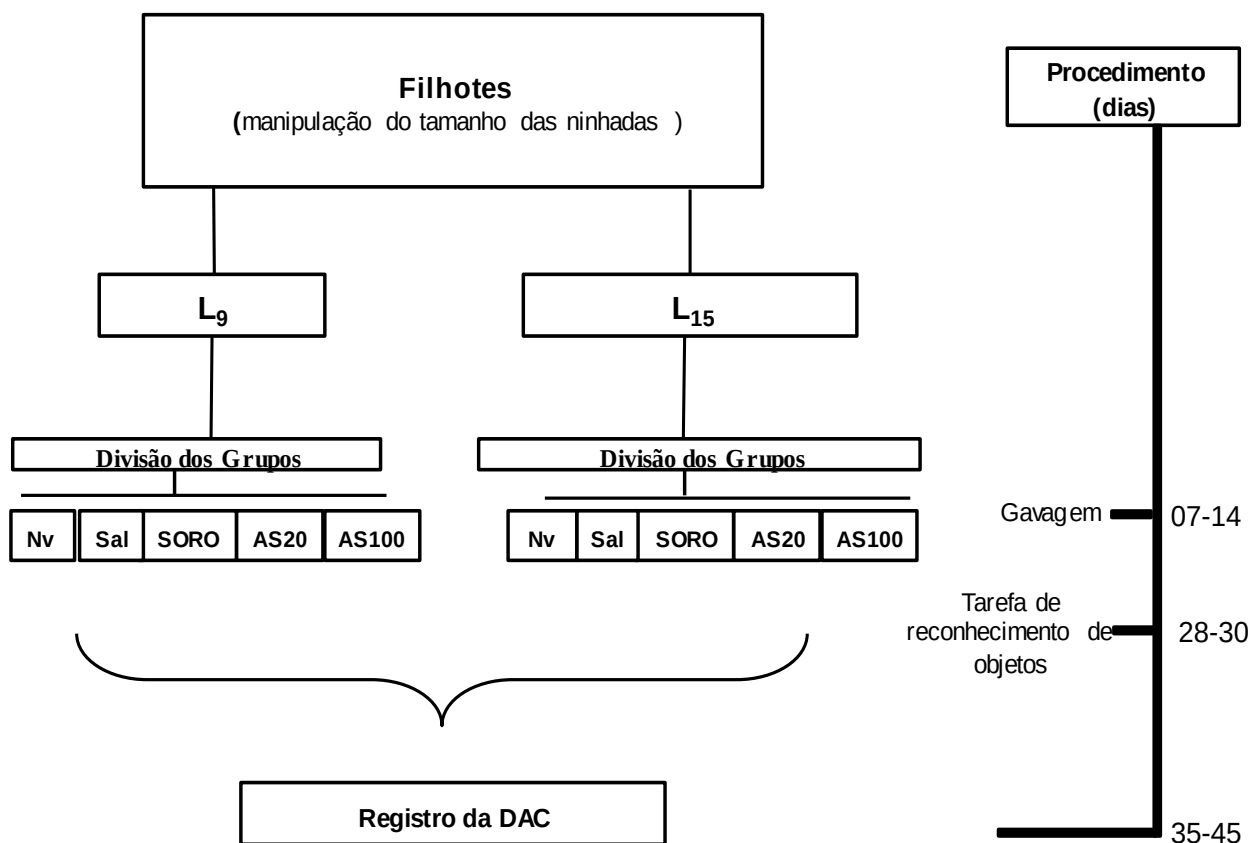


Figura 4. Representação esquemática dos grupos deste trabalho.

Legenda: DAC: Depressão Alastrante Cortical; L₉ e L₁₅ são animais em condição normal ou desfavorável de lactação (respectivamente em ninhadas com 9 e 15 filhotes). Nv: grupo “naïve”; Sal: grupo Solução Salina; SORO: grupo soro do leite de cabra em pó; AS20: grupo 20 mg/Kg Ácido N-acetilneuramínico; AS100: grupo 100 mg/Kg Ácido N-acetilneuramínico.

5.4 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A tarefa de reconhecimento de objeto tem como objetivo avaliar as memórias de curta duração espacial e de reconhecimento do animal. Ela se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao conhecido, num contexto anteriormente explorado.

O aparelho para a realização desse teste consiste em uma arena circular com 89 cm de diâmetro (campo aberto) localizada em uma sala com iluminação reduzida. Ao completarem 28 dias de idade, os ratos foram colocados, por 5 minutos na arena, para se adaptarem ao ambiente e a tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada nos dias seguintes à adaptação.

Nessa tarefa, foram avaliadas as diferenças entre os grupos, na capacidade de identificação de objetos com base na sua forma e localização no campo aberto.

Em cada uma das duas tarefas de reconhecimento de objetos (localização e forma), realizadas em dias diferentes, os animais, em uma primeira sessão, exploraram por 5 minutos o ambiente. Numa segunda sessão, após 50 minutos, foram avaliados o reconhecimento das características de forma e localização espacial dos objetos, como descrito adiante. Se, nessa segunda análise, diante de dois objetos, um conhecido e outro desconhecido, o rato reconheceu o objeto apresentado na primeira análise, ele, então, passaria mais tempo explorando o objeto desconhecido, demonstrando assim reconhecimento do objeto previamente apresentado. Entre as sessões, os objetos, bem como o campo aberto, foram adequadamente limpos com álcool a 70%, para eliminar pistas olfativas que pudessem influenciar o ensaio seguinte.

O critério para definir exploração foi baseado na “exploração ativa”, ou seja, quando o animal estava tocando os objetos pelo menos com o focinho (O’CALLAGHAN, et al., 2007; MELLO et al., 2008; DERE et al., 2005). Ennaceur e Delacour (1987) demonstraram esses métodos que foram utilizados para os testes de reconhecimento de objetos, brevemente descritos a seguir:

(1) Para avaliar a **distinção de localização espacial** (em P29): dois objetos idênticos (A e B) foram colocados em determinadas posições no campo aberto. Passados 50 minutos, o animal foi novamente colocado no campo aberto (segunda sessão) na presença dos mesmos objetos (A e B), todavia, neste segundo momento a posição de A se mantém (posição conhecida), porém a localização de B se modifica. Se o animal distingue uma posição desconhecida, ele gasta mais tempo explorando o objeto nessa posição.

(2) Na **discriminação das formas** (em P30): dois objetos idênticos (A e B) foram posicionados na arena para a primeira análise. Após 50 minutos, o animal foi recolocado no campo aberto (segunda sessão) com o mesmo objeto A (conhecido), porém, o objeto B foi substituído por outro, C (desconhecido), da mesma cor, tamanho e cheiro do objeto A, mas com uma forma diferente. O animal demonstra que pode diferenciar as formas quando, nessa segunda sessão, passa mais tempo explorando o objeto com a forma desconhecida.

5.5 DETERMINAÇÕES DE PESO CORPORAL

Em todos os grupos, os pesos corporais foram aferidos aos 7, 14, 28 dias de vida e no dia do registro eletrofisiológico (35-45 dias de vida), com auxílio de uma balança eletrônica da marca Filizola (capacidade de 3,0 kg e escala em divisão de 0,5 g).

5.6 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

No dia do registro, os animais foram anestesiados com 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) por via intraperitoneal. O animal foi colocado em decúbito ventral, sobre um aquecedor elétrico para manter a temperatura retal estável em torno de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. A cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotático modelo 900 (David Kopf). Uma incisão na pele da cabeça na linha média permitiu a remoção do periósteo e exposição da calota craniana que foi então trepanada, obtendo-se 3 orifícios ao nível do hemisfério direito. O primeiro orifício de 2-3 mm de diâmetro, na região frontal, foi utilizado para a estimulação necessária à deflagração da DAC. Os outros dois, de 3-4 mm de diâmetro, na região parietal, foram destinados à colocação de dois eletrodos através dos quais foi realizado o registro eletrofisiológico. Os orifícios foram alinhados na direção fronto-occipital e paralelos à linha média.

A cada 20 minutos, a DAC foi desencadeada por estimulação química: uma pelota de algodão, embebida em solução de KCl a 2% (aproximadamente 270 mMolar), foi colocada em contato com a superfície cortical, através do orifício de estimulação, durante um minuto. Após esse tempo, o estímulo químico foi retirado e a região enxugada com algodão a fim de remover o excesso de KCl. Essa estimulação, realizada na região frontal, provocou usualmente uma única “onda” de DAC que, ao se propagar, foi registrada pelos eletrodos colocados na região parietal.

A VLV que acompanha a DAC foi registrada continuamente por um período de 4 horas. Os dois eletrodos utilizados para o registro, bem como o eletrodo de referência comum (localizado no osso nasal), foram do tipo “prata-cloreto de prata”. Eles foram obtidos promovendo-se, por eletrólise, a formação de uma fina camada de cloreto de prata, em um fio de prata de 3 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Em seguida, duas pipetas de plástico (5 cm de comprimento, diâmetro inferior de 1mm e superior de 5 mm) já fixadas entre si e

com distância entre as suas pontas conhecida (variando entre 4 e 6 mm), foram preenchidas com solução de agar-Ringer a 0,5%, na qual os fios cloretados foram imersos. Esse par de eletrodos foi fixado à haste seguradora de eletrodos, do aparelho estereotáxico, que é acionado verticalmente pelo avanço e recuo de um parafuso. Dessa maneira, os eletrodos puderam ser baixados e postos em contato com a superfície cortical de forma suave, evitando-se pressão excessiva sobre a mesma. Os registros foram realizados em um sistema digital (EMG systems do Brasil Ltda), que permite o registro em computador. Com o auxílio do programa Windaq (versão 2.94), a velocidade de propagação da DAC foi calculada com base na distância entre os dois pontos corticais de registro (distância fixa para cada experimento) e no tempo necessário para que a DAC percorra essa distância.

5.7 EUTANÁSIA

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

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por meio do programa “Sigmastat”, versão 3.5, as diferenças inter-grupos foram analisadas utilizando-se a ANOVA de duas vias, seguida, quando necessário, pelo teste post hoc “Holm Sidak”. Foram incluídos como fatores o estado nutricional (L₉ *versus* L₁₅) e o tratamento (Nv, Salina, Soro, AS20 e AS100). Foram consideradas aceitas como significantes as diferenças em que $p < 0,05$.

6 NEONATAL ADMINISTRATION OF GOAT WHEY MODULATES MEMORY AND CORTICAL SPREADING DEPRESSION IN RATS PREVIOUSLY SUCKLED UNDER DIFFERENT LITTER SIZES: POSSIBLE ROLE OF SIALIC ACID

1. Introduction

Because of its nutritional composition, goat milk has been used into functional and children food and this has sparked the attention of researchers around the world ¹, especially due to its beneficial effects for the maintenance of health and physiological processes in the nutrition of children and elderly people ². The health benefits conferred by goat's milk are associated with its possible lower allergenic potential compared with cow's milk ³, and its large amount of medium and short chain triglycerides, as well as conjugated linoleic acid ^{1,4}.

A class of milk components that has been extensively studied is that of oligosaccharides. In human milk there is a significantly higher concentration of oligosaccharides than other ruminant species' milk ⁵. Some human health effects of human milk oligosaccharides have also been seen with the goat milk oligosaccharides ^{6,7}.

An oligosaccharide from milk that has been extensively studied is N-acetylneuraminic acid, the predominant form of the Sialic Acid family, that consists of 9-carbon sugars derived from neuraminic acid in humans ⁸. In mammals, the highest concentration of sialic acid is found in the central nervous system, mostly as structural and functional part in gangliosides and glycoproteins ⁹. Oligosaccharides are present in higher amounts in goat milk than cow's and sheep's milk ¹⁰. Goat milk has also a SA profile that is most similar to human milk. ¹¹ There is evidence of a positive correlation between the supplied amount of free SA ¹² or SA contained in a food source ¹³ and a greater cognitive development of animals. Also, several pieces of evidence suggest that endogenous SA influences excitability in the hippocampus ¹⁴ and dorsal root ganglion neurons ¹⁵, as well as myelination ¹⁶ and the glial-neuron interaction ¹⁷.

The obtainment of milk oligosaccharides from whole milk is expensive ¹⁸. Since most milk oligosaccharides go into the whey during cheese manufacturing ⁶, and as the whey cannot be directly discharged into the environment, using by-products from goat milk such as its whey, instead of the whole goat milk, can be a more economical and ecologically viable alternative to obtain oligosaccharides ¹⁹. In view of that, we decided to investigate in rats the effect of a goat milk byproduct, the dried goat whey (DGW) on memory and the brain excitability-dependent phenomenon known as cortical spreading depression (CSD).

CSD is a reversible brain electrophysiological phenomenon that is related to neural excitability. It was first described as a reduction in the spontaneous and evoked electrical activity of the cerebral cortex in response to a stimulation of one point of the cortex ²⁰. CSD has been demonstrated in many animal species, including humans ²¹. CSD represents a transient neuronal depolarization accompanied by a negative shift in the DC (direct current) potential of the brain tissue, a depression on electroencephalogram, then followed by a late cellular and synaptic hyperexcitability ²². The phenomenon has been linked to brain excitability disorders and their diseases such as migraine with aura ²³, multiple sclerosis ²⁴, and epilepsy ²⁵. Thus, CSD is an interesting and useful experimental model for evaluating the proper functioning of neural tissue ²⁶.

In mammals, early malnutrition alters several neural maturational events, resulting in long lasting, or even permanent behavioral abnormalities, changes in cognitive function and learning and memory disorders ^{27,28}. In the rat, suckling pups in large litters represents an unfavorable lactation condition that results in a moderate state of malnutrition ²⁹. In this context, this study aimed to investigate the possible actions of DGW on memory and CSD. We also tested the effect of sialic acid on this action. In addition, we compared animals

under favorable and unfavorable suckling conditions to evaluate whether nutritional deficiency would modulate DGW- and SA action on memory and CSD.

2. Material 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. n° 23076.041458/2014-44), whose norms comply with those established by the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Bethesda, MD, USA). Newborn male Wistar rats, born from distinct dams, were pooled and assigned to be suckled under normal or unfavorable conditions, represented, respectively, by litters with 9 pups (L₉ groups; n = 51) and litters with 15 pups (L₁₅ groups; n = 52). After weaning (postnatal day 21), 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 X 35.5 cm X 18.5 cm) under controlled temperature (23±1 °C) with a 12-h light:12-h dark cycle (lights on at 6:00 a.m.).

2.2 Goat whey and sialic acid treatment early in life

N-acetylneuraminic acid (from now on designated as sialic acid; abbreviated as SA) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Goat whey was obtained from production of cheese curd that was performed through the use of enzymatic coagulation, according to procedures adapted by Garcia and coworkers³⁰. The water of goat whey was then removed by using a Mini Spray Dryer (B290 Advanced, BUCHI) to obtain the whey powder. The goat milk used to produce the whey was taken from the lactation period with the highest amount of SA, as previously identified by our group⁴⁷. The physicochemical composition, including the

SA amounts of the whey powder (Araújo and coworkers, – unpublished data) is shown in Table 1.

From postnatal days 7 to 14, one group of L₉ (n=9) and one group of L₁₅ pups (n=10) received per gavage 17.45 g/kg/day dried goat Whey (DGW), which contains approximately 20 mg of SA³². Four other groups (two L₉ and two L₁₅ group) received 20 mg/kg/day SA and 100 mg/kg/day SA dissolved in saline solution (respectively groups SA20, with 11 L₉ and 10 L₁₅ pups, and groups SA100, with 11 L₉ and 9 L₁₅ pups).

Two additional control groups received no gavage (Nv = naïve group; 9 L₉ and 12 L₁₅ pups) or vehicle (saline solution; Sal group; 9 L₉ and 11 L₁₅ pups). The volume administered per gavage was 0.5 mL/day as previously described²⁹. We measured body weight at postnatal days 7, 14, and 28.

Table 1 - Physicochemical composition of dried goat whey.*

Variables	Mean ± SEM
Humidity (g/100g)	12,16 ± 0,69
Protein (g/100g)	5,96 ± 0,30
Fat (g/100g)	2,56 ± 0,25
Lactose %(m/m)	31,16 ± 1,58
Fixed mineral residue (g/100g)	2,23 ± 0,11
Titrateable acidity	0,46 ± 0,03
pH	6,6-7,2
Sialic acid (mg/100g)	306,56 ± 10,77
NeuAc (mg/100g)	114,61 ± 7,08
NeuGc (mg/100g)	191,95 ± 3,68

*Unpublished data from Araújo and coworkers – with permission of the authors

Values are means of triplicate measurements. NeuAc = N-acetylneuraminic acid; NeuGc = N-Glycolylneuraminic acid

2.3 Object recognition test

We tested the animals in the object recognition paradigm. This aims to evaluate the animal's ability to recognize unfamiliar objects based on its shape or spatial position. It is based on the animal's natural tendency, during the test, to spend more time exploring one novel object over another known, previously explored object ³³.

The apparatus for performing this test consists of a circular arena with 89 cm in diameter (open field) located in a room with low light intensity. When the animal reached 28 days of life, it was placed for 5 minutes in the arena to adapt to the environment. The task for spatial position recognition and shape recognition occurred respectively on the 29th and 30th days of life. In each of these two tasks, in a first session the animals explored for 5 minutes two objects placed in the arena. The animal returned to the arena after a 50 min interval. In this second session, the animal had to recognize that one of the objects was moved to a novel spatial position (day 29), or that one of the objects has been replaced for another one with different shape (day 30). After each session, the objects, and the open field, were properly cleaned with 70% alcohol, to eliminate olfactory cues that could influence the following session.

The criterion for defining exploration was based on "active operation", i.e. when the animal was touching objects at least with the nose ³⁴.

2.4 CSD recording

On the day of the electrophysiological recording (35-45 postnatal days), each animal was anesthetized with a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose injected

intraperitoneally. Three trephine holes were drilled on the right side of the skull, aligned in the frontal-to-occipital direction and parallel to the midline. One hole was positioned on the frontal bone (2 mm in diameter) and used to apply the stimulus (KCl) to elicit CSD. The other two holes were positioned on the parietal bone (3–4 mm in diameter) and used to record the propagating CSD wave. CSD was elicited at 20-min intervals by a 1-min application of a cotton ball (1–2 mm in diameter) soaked with KCl solution (2 g KCl dissolved in 100 ml distilled water; approximately 270 mM) to the anterior hole drilled at the frontal region. Rectal temperature was continuously monitored and maintained at 37 ± 1 °C by means of a heating blanket. The DC slow potential change accompanying CSD was recorded for 4 h using two Ag–AgCl agar–Ringer electrodes (one in each hole) against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bones. We calculated the CSD velocity of propagation from the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical electrodes. In the two cortical recording places, we used the initial point of each DC-negative rising phase as the reference point to calculate the CSD velocities. In addition, we calculated amplitude and duration of the CSD waves, as previously reported ²⁹.

2.5 Statistics

Results in all groups are expressed as the means $\pm$ standard deviations. CSD propagation rates were compared between groups using ANOVA, including as factors lactation conditions (L₉ and L₁₅) and gavage treatment (naïve, saline, dried goat whey and SA) followed by a post hoc test (Holm–Sidak), where indicated. We considered *p* values less than 0.05 as significant.

3. Results

3.1 Body weight

In the four groups, ANOVA showed a main effect of the lactation condition for body weight during the whole suckling period ($p < 0.05$). The L₁₅ animals presented with lower ($p < 0.05$) body weights compared with the L₉ groups. In the L₉ condition, treatment with 100 mg/kg/d of SA was associated, on day 14, with lower body weight as compared with all other groups ($p < 0.05$). In the L₁₅ condition, on the 14th postnatal day the two groups treated with SA, and the group that received DGW showed higher weight values than the two control groups ($p < 0.05$). Data on body weights are illustrated in Fig. 1.

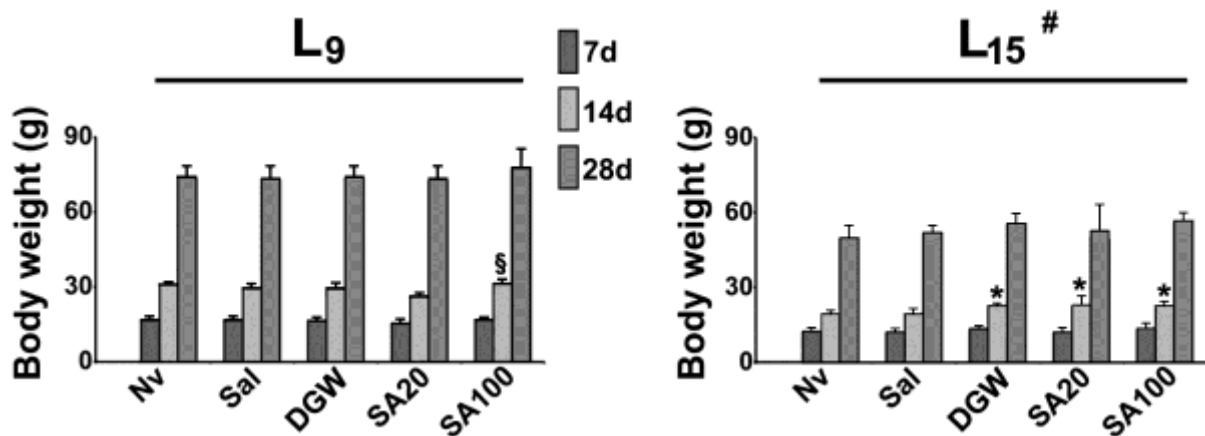


Figure 1 Body weight of rats that were suckled in litters with 9 and 15 pups (respectively L9 and L15 condition). Data are mean $\pm$ standard deviation for 51 L9 and 53 L15 rats. # indicates intergroup difference (L9 > L15; $p < 0.05$). *= significantly higher than the corresponding L15 control groups ($p < 0.05$). §= significantly lower than all other age-matched L9 groups ($p < 0.05$). Nv = naïve (no gavage treatment). Sal = saline. DGW = dried goat whey. SA20 = SA acid 20mg/Kg. SA100 = SA acid 100mg/Kg.

3.2 Object recognition test

In the spatial position recognition task, the L₁₅ group that was treated with DGW presented with a longer percentual exploration time ($57.4 \pm 16.1\%$) of the object placed in a novel position than the naïve ($27.1 \pm 8.6\%$) and saline ($31.3 \pm 22.0\%$) controls ($p < 0.05$).

In the shape recognition task, the L₉ group that was treated with DGW displayed a longer percentual exploration time ($53.2 \pm 24.3\%$ of the novel-shape object than the naïve group ($14.7 \pm 8.4\%$). In the L₁₅ condition, the groups treated with DGW and 100 mg/kg/d SA acid explored the novel object for a longer time (respectively $52.0 \pm 30.4\%$ and $42.1 \pm 10.3\%$) than both naïve ($13.9 \pm 13.3\%$) and saline ($14.0 \pm 6.7\%$) controls ($p < 0.05$).

3.3 CSD velocity of propagation

In all groups, stimulation with 2% KCl at one point of the frontal cortical surface for 1 min elicited a single CSD wave that propagated without interruption and was recorded at the two parietal recording points (Fig. 2; see the recording points in the skull diagrams). During the 4-h recording, the appearance of the slow potential change after each KCl stimulation (performed at 20-min intervals; see methods) confirmed the presence of CSD.

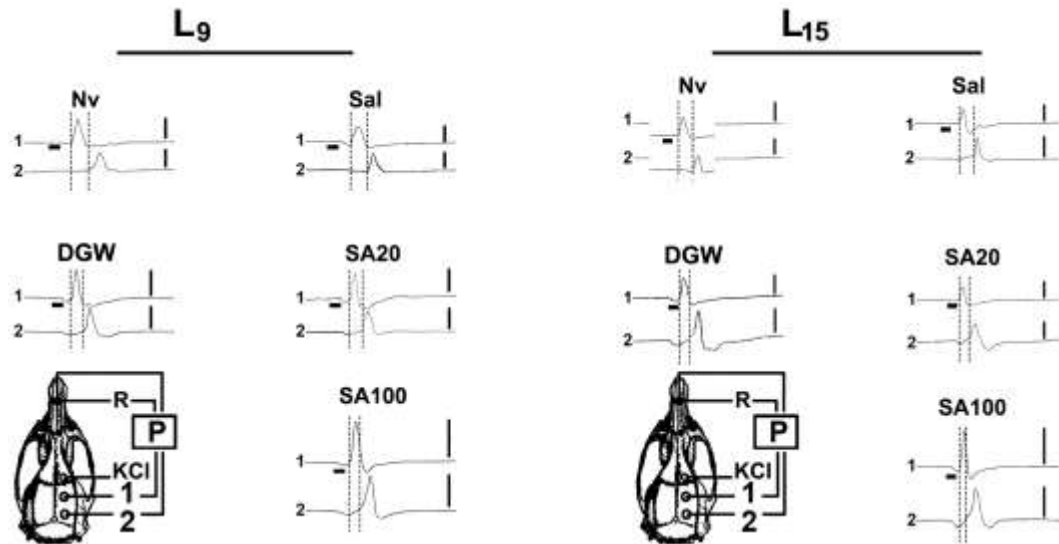


Figure 2 Recordings of the slow potential changes (P) during cortical spreading depression (CSD) at two cortical points (1 and 2) in L₉ rats (left) and L₁₅ rats (right). The diagrams of the skull show recording positions 1 and 2 from which the traces marked at the left with the same numbers were obtained. The position of the common reference electrode (R) on the nasal bones and the application point of the CSD-eliciting stimulus (KCl) are also shown. Nv, naïve group (no gavage treatment); Sal, DGW, SA20 and SA100 are groups treated per gavage with saline, dried goat whey, SA 20 mg/Kg and SA 100 mg/Kg, respectively. The vertical bars indicate 10 mV for P (negative upwards). The horizontal bar under trace 1 indicates 1-min stimulation with KCl. The vertical dashed lines indicate the latency for a CSD wave to cross the inter-electrode distance.

Both in L₉ and L₁₅ rats, ANOVA indicated intergroup differences, and *post hoc* (Holm–Sidak) test comparisons showed that the velocities were higher ($p < 0.001$) in the L₁₅ groups compared to the L₉ groups. Regarding the gavage treatment, ANOVA detected a main effect, and *post hoc* testing revealed that treatment with DGW and SA in both doses of 20 mg/Kg and 100 mg/Kg significantly enhanced the CSD propagation velocities ($p < 0.05$) compared with the naïve and saline controls in both lactation conditions. In addition, the

groups that received the higher dose of SA (SA100) displayed CSD velocities that were higher than the corresponding SA20 and DGW groups ($p < 0.05$).

In the L₉ animals, the CSD velocity (mean $\pm$ SD in mm/min) in the naïve and saline controls was respectively 3.84 ± 0.07 and 3.88 ± 0.08 . In the experimental groups treated with DGW and 20 mg/Kg and 100 mg/Kg of SA, the CSD velocity was significantly higher than the controls (respectively 4.21 ± 0.14 ; 4.22 ± 0.20 and 4.67 ± 0.11 ; $p < 0.05$). In the L₁₅ animals, the CSD velocities in the control groups were higher than in the L₉ rats (4.58 ± 0.29 and 4.57 ± 0.13 for the naïve and saline groups, respectively). Treatment with DGW and SA resulted in higher CSD velocity compared with L₁₅ controls (4.87 ± 0.31 for the DGW group, 4.93 ± 0.17 for the 20 mg/Kg SA group and 5.47 ± 0.27 for the 100 mg/Kg SA group $p < 0.05$). Data on CSD velocity are in Fig. 3.

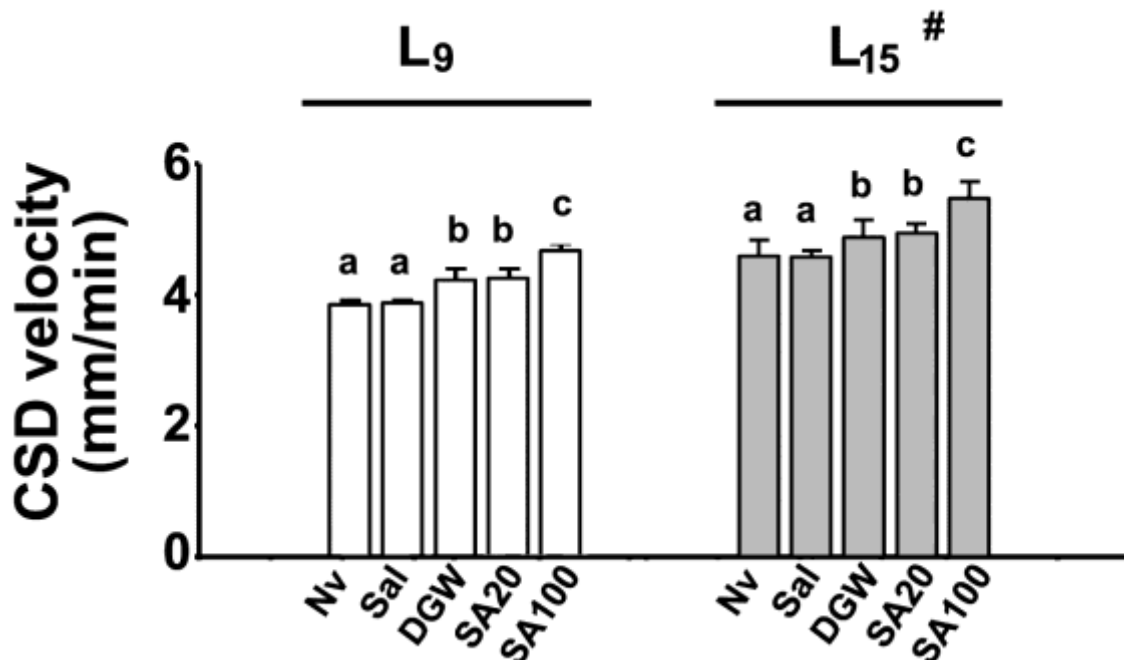


Figure 3 CSD velocities of 35–45 days old rats that were suckled in litters with 9 and 15 pups (respectively L₉ and L₁₅ condition). Data are mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate values that are significantly different among groups in the same lactation condition ($p < 0.05$). # indicates intergroup difference (L₉ < L₁₅; $p < 0.05$). Nv = naïve (no gavage

treatment). Sal = saline. DGW = dried goat whey. SA20 = SA 20mg/Kg. SA100 = SA 100mg/Kg.

3.4 Amplitude and duration of CSD waves

The mean amplitude of the negative slow potential change of CSD varied from 10.10 ± 4.30 to 13.65 ± 2.44 mV in the L₉ groups and from 11.46 ± 3.89 to 13.28 ± 3.15 mV in the L₁₅ groups. Although no intergroup difference was observed, there was a nonsignificant tendency to increased amplitudes in the SA20, SA100 and DGW groups compared to the control groups.

The mean duration of the negative slow potential change of CSD varied from 70.97 ± 6.41 s to 95.41 ± 5.55 s in the L₉ groups and from 67.57 ± 5.49 s to 77.46 ± 7.49 s in the L₁₅ groups. In the L₉ condition, the three experimental groups had lower duration in comparison with the control groups ($p < 0.05$), and the group with the highest dose of SA (SA100) displayed significantly lower duration (70.97 ± 6.41 s) than the SA20 (78.98 ± 6.26 s) and DGW (78.86 ± 5.95 s) groups ($p < 0.05$). In the L₁₅ condition, only the treatment with 100 mg/kg of SA decreased significantly the CSD duration (67.57 ± 5.49 s) in comparison with the naïve group (76.9 ± 8.21 s) and saline (77.46 ± 7.49 s) controls ($p < 0.05$), showing a smaller effect of SA administration in lower doses. Regarding CSD duration, ANOVA revealed an interaction between treatment and nutritional status ($p < 0.05$).

4. Discussion

Our data clearly demonstrate that in the L₁₅ condition treatment with DGW improves memory in two object recognition tasks compared with controls. In line with this observation, rats fed a goat milk based formula-enriched diet have a better spatial cognitive ability compared with control rats³⁵. However, no possible mechanisms underlying the improvement

in spatial cognitive ability are so far established. Based on the results of the present study we hypothesize that SA, which is abundant in the goat milk, is involved in the behavioral and electrophysiological actions here described. In fact, memory effects have been reported in SA-treated rats ¹². Also, Wang and coworkers ¹³ demonstrated that piglets treated with SA from a food source performed better than controls in learning and memory tests.

In contrast to the effects on CSD, administration of SA in a concentration (20 mg/kg) that mimics the concentration found in DGW did not improve the object recognition memory of L₁₅ animals. We postulate that other nutrients present in DGW, as taurine and conjugated linoleic acid, are a necessary support for SA to improve memory in DGW-treated animals under unfavorable lactation condition. Goat milk is a rich source of taurine ³⁶ and the administration of this amino acid is involved with the recovery of learning and memory in a mouse model of Alzheimer's disease ³⁷ and improvement of impaired learning and memory ability caused by excessive exposure to aluminum ³⁸. Finally, goat milk is a good source of conjugated linoleic acid, which can enhance CSD propagation ³⁹ and improve memory in rats via increment in phospholipase A2 activity ⁴⁰. Interestingly, the activity of this enzyme is reportedly reduced in the brains of patients with Alzheimer disease ⁴¹. Also, it was suggested that conjugated linoleic acid can affect myelination, a process that is crucial for CSD propagation ⁴².

Although in this study we did not monitor the brain levels of SA, based on evidence in the literature we consider as reasonable to assume that treatment with SA and DGW might have increased brain SA levels ^{13, 32, 43}. The present study is in line with that observation regarding the effect of both DGW and synthetic SA on the propagation of CSD. According to this, we propose that SA containing in DGW plays an important role on the brain excitability-related CSD effects. This is also coherent with previous reports on the actions of SA on excitability in hippocampus ¹⁴, dorsal root ganglion neurons ¹⁵, myelination process ¹⁶, and

microglia-neuron interaction¹⁷. CSD is an excitability-related neural response²⁰ and changes in cortical excitability observed during CSD led to the suggestion that CSD-related excitability alterations could contribute to the pathophysiology of some neurological disorders, such as epilepsy²⁵. Interestingly, the enzyme neuraminidase (NEU), which is the key enzyme that cleaves SA, exerts a powerful anticonvulsant action¹⁴. Our data on the SA effects on CSD propagation are compatible with the above evidence.

The importance of SA in glia-neuron interaction comes from SA binding to receptors known as SA-binding immunoglobulin superfamily lectins (SIGLECS)⁴⁴. Removal of SAs affects neuron integrity, changes microglial morphology and reduces neurite density in comparison to control co-cultures¹⁷; genetically modified mice with impaired sialylation presented an increase in infiltration of microglia and astrocyte in the corpus callosum¹⁶; and overexpression of PSA-NCAM leads to a delay in oligodendrocyte maturation⁴⁵. These findings indicate that regulation of the SA level is necessary to normal glia-neuron interaction. Since glial impairment facilitates CSD⁴⁶, the administration of SA (this study) may affect CSD through abnormal glial-neuron interaction.

One limitation of our study is that all hypotheses and suggestions designed to explain the mechanisms underlying the role of SA on DGW and CSD were based on studies in which the focus was a type of SA, Neu5Ac, the unique form synthesized by humans. There is another type of SA, the Neu5Gc, which, in contrast to rats, human beings cannot synthesize⁴⁷. This SA family member may be incorporated by humans through diet and has been associated with several diseases such as cancer⁴⁸. Thus, more studies using the Neu5Gc alone are necessary for careful evaluation of its isolated effect on CNS excitability, specifically on the CSD.

Body weights were lower in the L₁₅ group compared with the L₉ group, confirming the effectiveness of increasing litter size in producing malnutrition⁴⁹. These data confirm

previous studies on malnutrition provoked in the rat by manipulation of the litter size ²⁹. Malnutrition facilitates CSD in the rat brain ²⁹, and this condition has been extensively demonstrated in our laboratory ^{26,29}, and confirmed in the present study, as indexed by the CSD velocities in the naïve and saline conditions, which were higher in the L₁₅ group, as compared to the L₉ one (see Figure 3).

The damage caused by malnutrition may result from changes in the structure and function of brain ²⁸, and this may be involved in the facilitating effects on CSD. Some hypotheses are raised by our group about the mechanisms through which early malnutrition enhances CSD propagation: (1) the reduction of the uptake of extracellular glutamate ⁵⁰, which may facilitate CSD propagation ⁵¹; (2) malnutrition-induced increase in cell packing density is accompanied by reductions in the volume of the extracellular space, which are thought to increase the CSD propagation rate ²⁶; (3) malnutrition impairs glial function ²⁷, and this glial impairment facilitates CSD ⁴⁶; (4) finally, nutritional deficiency reduces brain myelination ²⁷ and increases CSD propagation velocity ²⁹, which is in agreement with Merkler et al. ⁴² who demonstrated an inverse correlation between the degree of cortical myelination and the CSD propagation velocity as mentioned above.

5. Conclusion

In conclusion, our data documented in the rat brain a novel, facilitating effect of goat whey and exogenous sialic acid on the excitability-related phenomenon (CSD) that has causally been associated to important neurological diseases like epilepsy. The data support the hypothesis of SA's action on neuronal excitability and advance the understanding of the mechanisms by which SA can influence brain electrophysiological properties. Additionally, goat whey was effective in improving memory of rats that suffered food restriction in the critical period of development. Although extrapolating the results to humans requires caution,

the goat whey can be an economical and ecologically viable alternative for supplementation of malnourished children.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Marta Suely Madruga for providing the spray drier facility, and Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros for providing the goat milk. The financial support from CNPq (Edital agronegócio 403020/2013-0 and Edital universal 445101/2014-8), CAPES (AUXPE – CIMAR 1990/2014), and MCT/FINEP/CT-INFRA – PROINFRA – 01/2008. R.C.A. Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 303636/2014-9).

REFERENCES

- 1 N. Silanikove, G. Leitner, U. Merin, C.G. Prosser, Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects, *Small Rumin. Res.* 89 (2010) 110–124
- 2 A.C. Ribeiro, S.D.A. Ribeiro, Specialty products made from goat milk, *Small Rumin. Res.* 89 (2010) 225–233.
- 3 E.I. El-Agamy, The challenge of cow milk protein allergy, *Small Rumin. Res.* 68 (2007) 64–72
- 4 G.F.W. Haenlein, Goat milk in human nutrition, *Small Rumin.* 51 (2004) 155–163.
- 5 A. Martinez-Ferez, S. Rudloff, A. Guadix, C.A. Henkel, G. Pohlentz, J.J. Boza, E.M. Guadix, C. Kunz, Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 173–181
- 6 D.L. Oliveira, A. Costabile, R.A. Wilbey, A.S. Grandison, L.C. Duarte, L.B. Roseiro, In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of caprine cheese whey oligosaccharides in batch culture systems, *Biofactors.* 38 (2012) 440–449
- 7 F. Lara-Villoslada, E. Debras, A. Nieto, A. Concha, J. Gálvez, E. López-Huertas, J. Boza, C. Obled, J. Xaus, Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis, *Clin Nutr.* 25 (2006) 477–488
- 8 B. Wang, Molecular Mechanism Underlying SA as an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition, *Adv. Nutr.* 3 (2012) 465–472
- 9 B. Wang, J. Brand-Mille, The role and potential of SA in human nutrition, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 1351–1369
- 10 T. Urashima, E. Taufik, K. Fukuda, S. Asakuma, Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals, *Biosci Biotechnol Biochem.* 77 (2013) 455–466

- 11 A. Kiskini, E. Difilippo, Oligosaccharides in goat milk: structure, health effects and isolation, *Mol Cell Biol.* 59 (2013) 25-30
- 12 B.L.G. Morgan, M. Winick, Effects of Administration of N-Acetylneuraminic Acid (NANA) on Brain NANA Content and Behavior, *J Nutr.* 110 (1980) 416-424
- 13 B. Wang, B. YU, M. Karim, M. Hu, Y. Sun, P. McGreevy, P. Petocz, S. Held, J. Brand-Miller, Dietary SA supplementation improves learning and memory in piglets, *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (2007) 561–569.
- 14 E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova, G. Skibo, G.L. Holmes, D. Isaev, Effect of neuraminidase treatment on persistent epileptiform activity in the rat hippocampus, *Pharmacol. Rep.* 63 (2011) 840-844
- 15 X.Q. Peng, X.L. Zhang, Y. Fang, W.R. Xie, Y.K. Xie, Sialic acid contributes to hyperexcitability of dorsal root ganglion neurons in rats with peripheral nerve injury, *Brain Res.* 1026 (2004) 185-193
- 16 S.W. Yoo, M.G. Motari, K. Susuki, J. Prendergast, A. Mountney, A. Hurtado, R.L. Schnaar, Sialylation regulates brain structure and function. *FASEB J.* 29 (2015) 3040-3053
- 17 P. Wielgat, J.J. Braszko, The participation of sialic acids in microglia–neuron interactions, *Cell. Immunol.* 273 (2012) 17–22
- 18 D.L. Oliveira, R.A. Wilbey, A.S. Grandison , L.C. Duarte, L.B. Roseiro, Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. *Int. Dairy J.* 24 (2012)
- 19 D.L. Oliveira, R.A. Wilbey, A.S. Grandison , L.C. Duarte, L.B. Roseiro, Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. *Int. Dairy J.* 24 (2012)

- 20 A.A.P. Leão, Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 7 (1944) 359–390
- 21 M. Fabricius, S. Fuhr, L. Willumsen, J.P. Dreier, R. Bhatia, M.G. Boutelle, J.A. Hartings, R. Bullock, A.J. Strong, M. Lauritzen, Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain, *Clin. Neurophysiol.* 119 (2008) 1973–1984
- 22 M.K. Ghadiri, M. Kozian, N. Ghaffarian, W. Stummer, H. Kazemi, E.J. Speckmann, A. Gorji, Sequential changes in neuronal activity in single neocortical neurons after spreading depression, *Cephalalgia.* 32 (2012) 116–124
- 23 M.D. Ferrari, R.R. Klever, G.M. Terwindt, C. Ayata, A.M.J.M. Van Den Maagdenberg, Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics, *Lancet Neurol.* 14 (2015) 65-80
- 24 D.A. Pusic, H.M. Mitchell, P.E. Kunkler, N. Klauer, R.P. Kraig, Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling, *Exp. Neurol.* 264 (2015) 43-54
- 25 Y. Wei, G. Ullah, S.J. Schiff, Unification of neuronal spikes, seizures, and spreading depression, *J. Neurosci.* 34 (2014) 11733-11743
- 26 R.C.A. Guedes, Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition, in: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin (eds.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*, 2011, pp. 2343-2355
- 27 P.J. Morgane, M. Miller, T. Kemper, W. Stern, W. Forbes, R. Hall, J. Bronzino, J. Kissane, E. Hawrylewicz, O. Resnick, The Effects of Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System in the Rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2 (1978) 137-230

- 28 M. Alamy, W.A. Bengelloun, Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (2012) 1463-1480
- 29 E.S. Francisco, R.C.A. Guedes, Neonatal taurine and alanine modulate anxiety like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes, *Amino Acids.* 47 (2015) 2437-2445
- 30 E.F. Garcia, M.E. De Oliveira, R.C. Queiroga, T.A. Machado, E.L. De Souza, Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 63 (2012) 947-956.
- 31 Y.R.F. Sousa, M.A.V Silva, R.G. Costa, C.A. Azevedo Filho, E.P. Paiva, R.C.E.R. Queiroga, Sialic acid content of goat milk during lactation, *Livest Sci.* 177 (2015) 175–180.
- 32 S.E. Carlson, S.G. House, Oral and Intraperitoneal Administration of N-Acetylneuraminic Acid: Effect on Rat Cerebral and Cerebellar N-Acetylneuraminic Acid, *J. Nutr.* 116 (1986) 881-886
- 33 A. Ennaceur, J. Delacour, Effect of combined or separate administration of piracetam and choline on learning and memory in the rat, *Psychopharmacology.* 92 (1987) 58-67
- 34 M. Han, J. Kim, Effect of dietary iron loading on recognition memory in growing rats, *PLoS One.* 6 (2015)
- 35 M. Xu, L. Wei, Z. Dai, Y. Zhang, Y. Li, J. Wang, Effects of goat milk-based formula on development in weaned rats. *Food Nutr. Res.* 59 (2015)
- 36 S.M. Rutherford, P.J. Moughan, D. Lowry, C.G. Prosser, Amino acid composition determined using multiple hydrolysis times for three goat milk formulations, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59 (2008) 679-690

- 37 H.Y. Kim, H.V. Kim, J.H. Yoon, B.R. Kang, S.M. Cho, S. Lee, J.Y. Kim, J.W. Kim, Y. Cho, J. Woo, Y. Kim, Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease, *Sci Rep.* 4 (2014) 7467. doi: 10.1038/srep07467.
- 38 L. Wenting, L. Ping, J. Haitao, Q. Meng, R. Xiaofei, Therapeutic effect of taurine against aluminum-induced impairment on learning, memory and brain neurotransmitters in rats, *Neurol Sci.* 35 (2014) 1579-1584
- 39 J.K.B. Soares, A.P.R. Melo, M.C. Medeiros, R.C.R.E. Queiroga, M.A.D. Bomfim, A.F.O. Souza, A.L.V. Nascimento, R.C.A. Guedes, Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny, *Biochim. Biophys. Acta.* 1820 (2012) 1490–1495
- 40 M.A. Gama, N.R. Raposo, F.B. Mury, F.C. Lopes, E. Dias-Neto, L.L. Talib, W.F. Gattaz, Conjugated linoleic acid-enriched butter improved memory and up-regulated phospholipase A2 encoding-genes in rat brain tissue, *J Neural Transm (Vienna)*. 122 (2015) 1371-1380
- 41 W.F. Gattaz, N.J. Cairns, R. Levy, H. Förstl, D.F. Braus, A. Maras, Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 246 (1996) 129-131
- 42 D. Merkler, F. Klinker, T. Jürgens, R. Glaser, W. Paulus, B.G. Brinkmann, M.W. Sereda, C. Stadelmann-Nessler, R.C.A. Guedes, W. Brück, D. Liebetanz, Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content, *Ann. Neurol.* 66 (2009) 355-365.
- 43 S.A. Scholtz, B.S. Gottipati, B.J. Gajewski, S.E. Carlson, Dietary Sialic Acid and Cholesterol Influence Cortical Composition in Developing Rats, *J. Nutr.* 143 (2013) 132-135

- 44 B. Linnartz-Gerlach, M. Mathews, H. Neumann, Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid Binding immunoglobulin-like lectins, *Neurosci.* 275 (2014) 113–124
- 45 S.N. Fewou, H. Ramakrishnan, H. Bussow, V. Gieselmann, M. Eckhardt, Down-regulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation, *J Biol. Chem.* 282 (2007) 16700–16711
- 46 C. Largo, J.M. Ibarz, O. Herreras, Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ, *J. Neurophysiol.* 78 (1997) 295-307
- 47 P. Tangvoranuntakul, P. Gagneux, S. Diaz, M. Bardor, N. Varki, A. Varki, E. Muchmore, Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2003) 12045-12050
- 48 Y. Chen, L. Pan, N. Liu, F.A. Troy II, B. Wang, LC–MS/MS quantification of N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3- to 5-year-old children, *Br. J. Nutr.* 111 (2014) 332–341
- 49 A.S. Hernandez, A.L. Françolin-Silva, C.T. Valadares, M.T.H. Fukuda, S.S. Almeida, Effects of different malnutrition techniques on the behaviour of rats tested in the elevated T-maze, *Behav. Brain Res.* 162 (2005) 240-245
- 50 A.M Feoli, I. Siqueira, L.M.V. Almeida, A.C. Tramontina, C. Battu, S.T. Wofchuk, C. Gottfried, M.L. Perry, C.A. Gonçalves, Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition, *J. Nutr.* 136 (2006) 2357–2361
- 51 A. Tottene, R. Conti, A. Fabbro, D. Vecchia, M. Shapovalova, M. Santello, A.M. Van Den Maagdenberg, M.D. Ferrari, D. Pietrobon, Enhanced excitatory transmission at cortical

synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron*. 61 (2009) 762-773

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi visto pela primeira vez importante ação do ácido siálico exógeno, independente de condições de lactação, na facilitação da propagação da DAC, um fenômeno relacionado com a excitabilidade cerebral que tem sido causalmente associada a importantes distúrbios neurológicos como a epilepsia. Os dados apoiam os efeitos do Neu5A no aumento da excitabilidade neuronal e avançam a compreensão dos mecanismos pelos quais Neu5Ac pode influenciar propriedades eletrofisiológicas cerebrais. Nesse entendimento, desvendando os mecanismos adjacentes à conexão do ácido siálico e epilepsia, podem-se investigar possíveis tratamentos para esse distúrbio tão comum e que atinge milhares de pessoas em todo o mundo.

Adicionalmente, foi visto que o Neu5Ac isolado – forma predominantemente encontrada nos seres humanos teve um efeito sobre a DAC semelhante ao soro de leite de cabra. Esse resultado possivelmente mostra uma boa absorção do ácido siálico proveniente de um subproduto caprino e sua incorporação no cérebro. Sugere-se também que os efeitos neurais do soro do leite de cabra são devidos, ao menos em parte, ao Neu5Ac presente no leite. O leite de cabra possui um perfil de OS sialilados mais próximo ao leite humano, podendo trazer benefícios para a saúde de bebês que não são amamentados. Os mecanismos de ação dos OS sialilados no SNC ainda são objetos de estudo. Mais estudos são necessários para compreender se – e quais - outros compostos do soro atuam diretamente e indiretamente na DAC e na memória e quais as implicações para a saúde humana. O soro do leite de cabra foi eficaz na melhoria da memória dos animais que sofreram restrição alimentar durante o período crítico de desenvolvimento. Extrapolando os resultados para os seres humanos, o soro de leite de cabra pode ser uma alternativa econômica e ecologicamente viável para suplementação de crianças desnutridas.

7.1 PERSPECTIVAS

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

- Os efeitos da administração do Neu5Ac por vias diferentes (intraperitoneal e tópica) sobre a DAC.

- O possível efeito duradouro da administração dos compostos estudados na memória e DAC.
- Os efeitos do soro do leite de cabra e do Neu5Ac em neonatos amamentado sob condições favoráveis de lactação (ninhadas com número de filhotes reduzido).
- Os efeitos dos compostos estudados em diferentes modelos de desnutrição.
- Níveis cerebrais de Neu5Ac e Neu5Gc em animais tratados com Neu5Ac e soro do leite de cabra, objetivando correlacioná-los com os efeitos eletrofisiológicos descritos.
- Quantificação no soro do leite de cabra de ferro, taurina e CLA, objetivando correlacioná-los com os efeitos na memória.
- Níveis cerebrais de ferro, taurina e CLA em animais tratados com o soro do leite de cabra, objetivando correlacioná-los com os efeitos na memória.
- Os efeitos do soro do leite de cabra e do Neu5Ac em ratos submetidos a outros testes de memória, como o labirinto aquático de Morris.
- Os efeitos da administração do Neu5Gc isolado sobre a DAC e memória.
- A administração do Neu5Ac associado a modelos experimentais que mimetizam desordens neurológicas, como o modelo da pilocarpina.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES R.; SANTOS S.D.; CAHÚ T.B.; GUEDES R.C.A.; BEZERRA R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 8, p. 1417-1421, 2008.
- ACCIOLY, N. E.; BENEVIDES, R. D.; DA COSTA, B. L.; GUEDES, R. C. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **International Journal of Developmental** , v. 30, n. 5, p. 405-10, 2012.
- ALAMY, M.; BENGELLOUN, W. A.; Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 6, p. 1463-1480, 2012.
- ALAMY, M.; ERRAMI, M.; TAGHZOUTI, K.; SADIKI-TRAKI, F.; BENGELLOUN, W. A. Effects of postweaning undernutrition on behavior, memory and sensory reactivity in rats: implications of the dopaminergic system. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 1-2, p. 195–202, 2005.
- ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER JR. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 3, p. 389-402, 1996.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.S.S.; GERMANO, P.C.P.S.; NEGRÃO, Y.D.S.; GUEDES, R.C.A. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 70-75, 2013.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, P. C. F; LIMA, D. S. C; OZIAS, M. G; OLIVEIRA, M. B; GUIMARÃES, N. X; GUEDES, R. C. A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v. 200, n.2, p.275-282, 2006.
- AMARAL, A. C.; JAKOVCEVSKI, M.; MCGAUGHY, J. A.; CALDERWOOD, S. K.; MOKLER, D. J.; RUSHMORE, R. J.; GALLER, J. R.; AKBARIAN, S. A.; ROSENE, D. L. Prenatal protein malnutrition decreases KCNJ3 and 2DG activity in rat prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 12, n. 286, p. 79-86, 2015.
- AMARAL, A.P.B., BARBOSA, M.S.S., SOUZA, V.C., RAMOS, I.L.T., GUEDES, R.C.A. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. **Experimental Neurology**, v. 219, p. 492-498, 2009.
- AOAC. **Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis**. Washington D.C.: AOAC International, 2005.
- BAKHTI, M.; SNAIDERO, N.; SCHNEIDER, D.; AGGARWAL, S.; MÖBIUS, W.; JANSHOFF, A.; ECKHARDT, M.; NAVE, K. A.; SIMONS, M. Loss of

electrostatic cell-surface repulsion mediates myelin membrane adhesion and compaction in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 3143-3148, 2013.

BARDOR, M.; NGUYEN, D. H.; DIAZ, S.; VARKI, A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4228–37, 2005.

BECKER, C. G.; ARTOLA, A.; GERARDY-SCHAHN, R.; BECKER, T.; WELZL, H.; SCHACHNER, M. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 45, n. 2, p. 143–152, 1996.

BORBA, J. M.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; DOS SANTOS, A. A.; DA COSTA, B. L.; DA SILVA, R. P.; PASSOS, P. P.; GUEDES, R. C. Essential fatty acid deficiency reduces cortical spreading depression propagation in rats: a two-generation study. **Nutritional Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 144-50, 2010.

BOYZO A1, AYALA J, GUTIÉRREZ R, HERNÁNDEZ-R J. Neuraminidase activity in different regions of the seizing epileptic and non-epileptic brain. **Brain Research**, v. 964, n. 2, p. 211-217, 2003.

BRAND-MILLER, J. C.; MCVEAGH, P.; MCNEIL, Y.; MESSER, M. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. **Journal of Pediatrics**, v. 133, n. 1, p. 95–98, 1998.

BRONZINO, J. D.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J.; MOKLER, D.; MORGANE, P. J. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal long-term potentiation in freely moving rats. **Experimental Neurology**, v. 148, n. 1, p. 317-323, 1997.

CARLSON, S. E.; HOUSE, S. G. Oral and Intraperitoneal Administration of N-Acetylneuraminic Acid: Effect on Rat Cerebral and Cerebellar N-Acetylneuraminic Acid. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 5, p. 881-886, 1986.

CARLSON, S. E. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 720–726, 1985.

CHATURVEDI, P.; WARREN, C. D.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; PICKERING, L. K.; NEWBURG, D. S. Milk oligosaccharide profiles by reversed-phase HPLC of their perbenzoylated derivatives. **Analytical Biochemistry**, v. 251, n. 1, p. 89–97, 1997.

CHEN, Y.; PAN, L.; LIU, N.; TROY II, F. A.; WANG, B. LC–MS/MS quantification of N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3- to 5-year-old children. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 2, p. 332–341, 2014.

CHOU, H. H.; HAYAKAWA, T.; DIAZ, S.; KRINGS, M.; INDRIATI, E.; LEAKEY, M.; PAABO, S.; SATTA, Y.; TAKAHATA, N.; VARKI, A. Inactivation of CMP-N-

acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11736–11741, 2002.

CLOSE, B. E.; COLLEY, K. J. In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 51, p. 34586–34593, 1998.

COLLINS, B. E.; YANG, L. J. S.; MUKHOPADHYAY, G.; FILBIN, M. T.; KISO, M.; HASEGAWA, A.; SCHNAAR, R. L. Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1248–1255, 1997.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. Plasticity in the human central nervous system. **Brain A Journal of Neurology**, v. 129, Pt. 7, p. 1659-1673, 2006.

COPPA, G. V.; PIERANI, P.; ZAMPINI, L.; CARLONI, I.; CARLUCCI, A.; GABRIELLI, O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. **Acta Paediatrica**, v. 88, n. 430, 89–94, 1999.

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

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

CREMER, H.; LANGE, R.; CHRISTOPH, A. et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. **Nature**, v. 367, n. 6462, p. 455–459, 1994.

CRNIC, L. S. Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 13, n. 6, p. 615-628, 1980.

DADDAOUA, A.; PUERTA, V.; REQUENA, P.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A.; GUADIX, E.; DE MEDINA, F. S.; ZARZUELO, A.; SUÁREZ, M. D.; BOZA, J. J.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. Goat Milk Oligosaccharides Are Anti-Inflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 672-676, 2006.

DE AGUIAR, M. J.; DE AGUIAR, C. R.; GUEDES, R. C. Lithium/nutrition interaction in the brain: a single lithium administration impairs spreading depression in malnourished, but not in well-nourished rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 4. P. 159-164, 2011.

DE LUCA, B; CIOFFI, L. A; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Activitas Nervosa Superior**, v.19, n.3, p.130–131, 1977.

DÍAZ-CINTRA, S.; GONZÁLEZ-MACIEL, A.; ÁNGEL MORALES, M.; AGUILAR, A.; CINTRA, L.; PRADO-ALCALÁ, R. A. Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1–3 subfields of the dorsal hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 208, n. 1, p. 47–53, 2007.

DICKSON, J. J.; MESSER, M. Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. **Biochemical Journal**, v. 170, n. 2, p. 407–413, 1978.

DUNCAN, P. I.; RAYMOND, F.; FUERHOLZ, A.; SPRENGER, N. Sialic Acid Utilisation and Synthesis in the Neonatal Rat Revisited. **Plos One**, v. 4, n. 12, p. 1-10, 2009.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. Effect of combined or separate administration of piracetam and choline on learning and memory in the rat. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 58-67, 1987.

FARIAS-SANTOS, R.C.; LIRA, M.C.A.; PEREIRA, D.E.; SÁ, I.R.; PIMENTEL, M.R.F.; ARAÚJO, L.L.; GUEDES, R.C.A. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. **Neuroscience Letters**, v. 454, n. 3, p. 218-222, 2009.

FEOLI, A. M.; SIQUEIRA, I.; ALMEIDA, L. M. V.; TRAMONTINA, A. C.; BATTU, C.; WOFCHUK, S. T.; GOTTFRIED, C.; PERRY, M. L.; GONÇALVES, C. A. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 9, p. 2357–2361, 2006.

FRANCISCO, E. S.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, v. 47, n. 11, p. 2437-2445, 2015.

FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; DA SILVA HERNANDES A.; FUKUDA, M. T.; VALADARES, C. T.; ALMEIDA, S. S. Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. **Behavioural Brain Research**, v. 173, n. 2, p. 310-214, 2006.

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

FRYER, H. J. L.; HOCKFIELD, S. The role of polysialic acid and other carbohydrate polymers in neural structural plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 1, p. 113-118, 1996.

FUKUDA, M. T. H.; SILVA, A. L. F.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behavioural Brain Research**, v. 133, n. 2, p. 271–277, 2002.

GAGIANNIS, D.; ORTHMANN, A.; DANSSMANN, I.; SCHWARZKOPF, M.; WEIDEMANN, W.; HORSTKORTE, R. Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. **Glycoconjugate Journal**, v. 24, n. 2-3, p. 125–130, 2007.

GALLER, J. R. Children and famine: long term effects on behavioral development. **Ambulatory Child Health**, v. 7, n. 2, p. 85–95, 2001.

GARCIA, E. F.; DE OLIVEIRA, M. E.; QUEIROGA, R. C.; MACHADO, T. A.; DE SOUZA, E. L. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-956, 2012.

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

GIBSON, R. A. Long-chain polyunsaturated fatty acids and infant development. **The Lancet**, v. 354, n. 9194, p. 1919–1920, 1999.

GUEDES, R. C. A; AMANCIO-DOS-SANTOS, A; MANHÃES-DE-CASTRO, R; COSTA-CRUZ, R. R. G. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v.5, n.2, p.115-123, 2002.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M.C.; SILVA, A.T.; TEODÓSIO, N.R. Effect of dietary Lithium on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 7, 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, n. 10, p. 1407-1412, 1996.

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

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

GUEDES, R.C.A Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin (eds.), **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**, p. 2343-2355, 2011.

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

GUEDES, R.C.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M.S. Effect of pre and postnatal propylthiouracil administration on propagation cortical spreading depression of adults rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 10, p. 1123-1128, 1993.

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

GUEDES, R.C.A.; VASCONCELOS, C.A.C. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neuroscience Letters**, v. 442, n.2, p. 118-122, 2008.

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

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 155–163, 2004.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HEDLUND, M.; TANGVORANUNTAKUL, P.; TAKEMATSU, H.; LONG, J. M.; HOUSLEY, G. D.; KOZUTSUMI, Y.; SUZUKI, A.; WYNshaw-BORIS, A.; RYAN, A. F.; GALLO, R.; VARKI, N.; VARKI, A. N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 12, p. 4340–4446, 2007.

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

IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.; MURAKAMI, Y.; SUGAWARA, M. Inhibition of cholera toxin by human milk fractions and sialyllactose. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 417–419, 1995.

ISAACS, E. B.; FISCHL, B. R.; QUINN, B. T.; CHONG, W. K.; GADIAN, D. G.; LUCAS, A. Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development. **Pediatric Research**, v. 67, n. 4, p. 357-362, 2010.

ISAEVA, E.; LUSHNIKOVA, I.; SAVRASOVA, A.; SKIBO, G.; HOLMES, G. L.; ISAEV, D. Effect of neuraminidase treatment on persistent epileptiform activity in the rat hippocampus. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 3, p. 840-844, 2011.

ISAEV, D.; ISAEVA, E.; SHATSKIH, T.; ZHAO, Q.; SMITS, N. C.; SHWORAK, N. W.; KHAZIPOV, R.; HOLMES, G. L. Role of Extracellular Sialic Acid in Regulation of Neuronal and Network Excitability in the Rat Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11587–11594, 2007.

ISAEV, D.; ZHAO, Q.; KLEEN, J. K.; LENCK-SANTINI, P. P.; ADSTAMONGKONKUL, D.; ISAEVA, E.; HOLMES, G. L. Neuroaminidase Reduces Interictal Spikes in a Rat Temporal Lobe Epilepsy Model. **Epilepsia**, v. 52, n. 3, p. 12-15, 2011.

JOHNSON, D.; MONTPETIT, M. L.; STOCKER, P. J.; BENNETT, E. S. The Sialic Acid Component of the α_1 Subunit Modulates Voltage-gated Sodium Channel Function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44303-44310, 2004.

KAUR, G.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KUMAR, H. Hydrolysis of whey lactose using CTAB-permeabilized yeast cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 63–67, 2009.

KISKINI, A.; DIFILIPPO, E. Oligosaccharides in goat milk: structure, health effects and isolation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 25-30, 2013.

LAI, S. C.; CHEN, R. S.; WU, CHOU, Y. H.; CHANG, H. C.; KAO, L. Y.; HUANG, Y. Z.; WENG, Y. H.; CHEN, J. K.; HWU, W. L.; LU, C. S. A longitudinal study of Taiwanese sialidosis type 1: an insight into the concept of cherry-red spot myoclonus syndrome. **European Journal of Neurology**, v. 16, n. 8, p. 912-919, 2009.

LARA-VILLOSLADA, F.; DEBRAS, E.; NIETO, A.; CONCHA, A.; GÁLVEZ, J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; BOZA, J.; OBLED, C.; XAUS, J. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 477-488, 2006.

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

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 7, n. 1, 359–390, 1944a.

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

LI, C. X.; MA, G. Y.; GUO, M. F.; LIU, Y. Sialic acid accelerates the electrophoretic velocity of injured dorsal root ganglion neurons. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 6, p. 972-975, 2015.

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

LIMA, D. S. C.; MAIA, L. M. S. S.; BARBOZA, E. A.; DUARTE, R. A.; SOUSA, L. S.; GUEDES, R. C. A. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Science**, v.85, n.2, p.241-247, 2009.

LINNARTZ-GERLACH, B.; MATHEWS, M.; NEUMANN, H. Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid Binding immunoglobulin-like lectins. **Neuroscience**, v. 275, p. 113–124, 2014.

LISTER, J. P.; BLATT, G. J.; KEMPER, T. L.; TONKISS, J.; DEBASSIO, W. A.; GALLER, J. R.; ROSENE, D. L. Prenatal protein malnutrition alters the proportion but not numbers of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus of the adult Sprague-Dawley rat. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 165-178, 2011.

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

LUCAS, A.; MORLEY, R.; COLE, T. J.; LISTER, G.; LEESON-PAYNE, C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. **The Lancet**, v. 339, n. 8788, p. 261–264, 1992.

LUCAS, A.; MORLEY, R.; COLE, T. J. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. **BMJ**, v. 317, n. 7171, p. 1481–1487, 1998.

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

MALTA, A.; DE MOURA, E. G.; RIBEIRO, T. A.; TÓFOLO, L. P.; ABDENNEBI-NAJAR, L.; VIEAU, D.; BARELLA, L. F.; DE FREITAS MATHIAS, P. C.; LISBOA, P. C.; DE OLIVEIRA, J. C. Protein-energy malnutrition at mid-adulthood does not imprint long-term metabolic consequences in male rats. **European Journal of Nutrition**, p. 1-11, 2015.

MARTINEZ-FEREZ, A.; RUDLOFF, S.; GUADIX, A.; HENKEL, C. A.; POHLENTZ, G.; BOZA, J. J.; GUADIX, E. M.; KUNZ, C. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 173-181, 2006.

MARTINEZ-FEREZ, A.; ZAPATA, J. E.; GUADIX, A.; ALMECIJA, M. C.; GOMEZ, M.; GUADIX, E. M. Obtention of goat milk permeates enriched in lactose-derived oligosaccharides. **Desalination**, v. 245, p. 730-726, 2009.

MCGAUGHY, J. A.; AMARAL, A. C.; RUSHMORE, R. J.; MOKLER, D. J.; MORGANE, P. J.; ROSENE, D. L.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition leads to

deficits in attentional set shifting and decreases metabolic activity in prefrontal subregions that control executive function. **Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 6, p. 532-541, 2014.

MELLO, P. B.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 2, p. 301-309, 2008.

MORGAN, B. L. G. Nutritional requirements for normative development of the brain and behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 602, p. 127–32, 1990.

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

MIES, G.; PASCHEN, W. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. **Experimental Neurology**, v. 84, n. 2, p. 249-58, 1984.

MIYAGI, T.; YAMAGUCHI, K. Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. **Glycobiology**, v. 22, n. 7, p. 880–896, 2012.

MONTE-GUEDES, C.K.R.; ALVES, E.V.; VIANA-DA-SILVA, E.; GUEDES, R.C.A. Chronic treatment with ascorbic acid enhances cortical spreading depression in developing wellnourished and malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v. 496, n. 2, p. 191-94, 2011.

MORGAN, B. L. G.; WINICK, M. Effects of Administration of N-Acetylneuraminic Acid (NANA) on Brain NANA Content and Behavior. **The Journal of nutrition**, v. 110, n. 3, p. 416-24, 1980.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

MORGANE, P. J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The Effects of Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System in the Rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, R. J. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471–83, 2002.

NAKAYAMA, J.; ANGATA, K.; ONG, E.; KATSUYAMA, T.; FUKUDA, M. Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two

polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function. **Pathology International**, v. 48, n. 9, p. 665–77, 1998.

NRC – **National Research Council**. Nutrient requirements of small ruminants. 2007, 362p.

NEWBURG, D. S.; NEUBAUER, S. H. Carbohydrates in milks: analysis, quantities, and significance. In **Handbook of Milk Composition**. ed. RG Jensen, p. 273–338, 1995.

NOHLE, U.; SCHAUER, R. Uptake, metabolism and excretion of orally and intravenously administered, ¹⁴C- and ³H-labeled N-acetylneuraminic acid mixture in the mouse and rat. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 362, n. 11, p. 1495–1506, 1981.

NYE, B. L.; THADANI, V. M. Migraine and epilepsy: review of the literature. **Headache**, v. 55, n. 3, p. 359–380, 2015.

O'CALLAGHAN, R. M.; OHLE, R.; KELLY, A. M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 2, 362–366, 2007.

OLIVEIRA, C. J. B.; HISRIC, E. R.; MOURA, J. F. P.; GIVISIEZ, P. E. N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W. A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 64–69, 2011.

OLIVEIRA, D.L.; WILBEY, R.A.; GRANDISON, A. S.; DUARTE, L. C.; ROSEIRO, L. B. Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 102–106, 2012a.

OLIVEIRA, D. L.; COSTABILE, A.; WILBEY, R. A.; GRANDISON, A. S.; DUARTE, L. C.; ROSEIRO, L. B. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of caprine cheese whey oligosaccharides in batch culture systems. **Biofactors**, v. 38, n. 6, p. 440–449, 2012b.

PADLER-KARAVANI, V.; YU, H.; CAO, H.; CHOKHAWALA, H.; KARP, F.; VARKI, N.; CHEN, X.; VARKI, A. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. **Glycobiology**, v. 18, n. 10, p. 818–830, 2008.

PADLER-KARAVANI, V.; TREMOULET, A. H.; YU, H.; CHEN, X.; BURNS, J. C.; VARKI, A. A Simple Method for Assessment of Human Anti-Neu5Gc Antibodies Applied to Kawasaki Disease. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

PARKKINEN, J.; FINNE, J.; ACHTMAN, M.; VAISANEN, V.; KORHONEN, T. K. Escherichia coli strains binding neuraminyl alpha 2–3 galactosides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 111, n. 2, p. 456–461, 1983.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PENG, X. Q.; ZHANG, X. L.; FANG, Y.; XIE, W. R.; XIE, Y. K. Sialic acid contributes to hyperexcitability of dorsal root ganglion neurons in rats with peripheral nerve injury. *Brain Research*, v. 1026, n. 2, p. 185-193, 2004.

PROLO, L. M.; VOGEL, H.; REIMER, R. J. The lysosomal sialic acid transporter sialin is required for normal CNS myelination. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 49, p. 15355-15365, 2009.

RECIO-PINTO, E.; THORNHILL, W. B.; DUCH, D. S.; LEVINSON, S. R.; URBAN, B. W. Neuraminidase treatment modifies the function of electroplax sodium channels in planar lipid bilayers. *Neuron*, v. 5, n. 5, p. 675-684, 1990.

REGAN, C. M.; FOX, G. B. Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochemistry Research*, v. 20, n. 5, p. 593- 598, 1995.

REINKE, S. O.; LEHMER, G.; HINDERLICH, S.; REUTTER, W. Regulation and pathophysiological implications of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) as the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 390, n. 7, p. 591-599, 2009.

RIBEIRO, A. C.; RIBEIRO, S. D. A. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, v. 89, p. 225-233, 2010.

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

ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 5, p. 663-669, 1997.

ROOIJ, S. R.; WOUTERS, H.; YONKER, J. E.; PAINTER, R. C.; ROSEBOOM, T. J. Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 39, p. 16881-16886, 2010.

RUTISHAUSER, U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Review Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 26-35, 2008.

SAITOH, M.; ISHII, A.; IHARA, Y.; HOSHINO, A.; TERASHIMA, H.; KUBOTA, M.; KIKUCHI, K.; YAMANAKA, G.; AMEMIYA, K.; HIROSE, S.; MIZUGUCHI, M. Missense mutations in sodium channel SCN1A and SCN2A predispose children to encephalopathy with severe febrile seizures. *Epilepsy Research*, v. 117, p. 1-6, 2015.

SÁNCHEZ-DÍAZ, A.; RUANO, M. J.; LORENTE, F.; HUESO, P. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant

formulas. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 405–10, 1997.

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.

SAVOTCHENKO, A.; ROMANOV, A.; ISAEV, D.; MAXIMYUK, O.; SYDORENKO, V.; HOLMES, G. L.; ISAEVA, E. Neuraminidase Inhibition Primes Short-Term Depression and Suppresses Long-Term Potentiation of Synaptic Transmission in the Rat Hippocampus. **Neural Plasticity**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

SAVRASOVA, A. V.; LUSHNIKOVA, I. V.; ISAEVA, E. V.; SKIBO, G. G.; ISAEV, D. S.; KOSTYUK, P. G. The Effect of Neuraminidase Blocker on Gabazine-Induced Seizures in Rat Hippocampus. **International Journal of Physiology and Pathophysiology**, v. 1, n. 4, p. 329-334, 2010.

SCHELLER, D.; SZATHMARY, S.; KOLB, J.; TEGTMEIER, F. Observations on the relationship between the extracellular changes of taurine and glutamate during cortical spreading depression during ischemia, and within the area surrounding a thrombotic infarct. **Amino Acids**, v. 19, n. 3-4, p. 571-583, 2000.

SCHOLTZ, S. A.; GOTTIPATI, B. S.; GAJEWSKI, B. J.; CARLSON, S. E. 2013. Dietary Sialic Acid and Cholesterol Influence Cortical Composition in Developing Rats. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 2, p. 132-35, 2013.

SCHNAAR, R. L.; GERARDY-SCHAHN, R.; HILDEBRANDT, H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system Development, stability, disease, and regeneration. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 461–518, 2014.

SEDEL, F.; GOURFINKEL-AN, I.; LYON-CAEN, O.; BAULAC, M.; SAUDUBRAY, J. M.; NAVARRO, V. Epilepsy and inborn errors of metabolism in adults: a diagnostic approach. **The Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 6, p. 846-856, 2007.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 110–124, 2010.

SHEN, Z.; WARREN, C. D.; NEWBURG, D. S. High-performance capillary electrophoresis of sialylated oligosaccharides of human milk. **Analytical Biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 37–45, 2000.

SOARES, J. K. B.; MELO, A. P. R.; MEDEIROS, M. C.; QUEIROGA, R. C. R. E.; BOMFIM, M. A. D.; SOUZA, A. F. O.; NASCIMENTO, A. L. V.; GUEDES, R. C. A. Conjugated linoleic acid in the maternal diet differentially enhances growth and cortical spreading depression in the rat progeny. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 10, p. 1490–1495, 2012.

SOUSA, Y. R. F.; SILVA, M. A. V.; COSTA, R. G.; AZEVEDO FILHO, C. A.; PAIVA, E. P.; QUEIROGA, R. C. E. R. Sialic acid content of goat milk during lactation. **Livestock Science**, v. 177, p. 175–180, 2015.

SVENNERHOLM, L.; BOSTROM, K.; FREDMAN, P.; MANSSON, J. E.; ROSENGREN, B.; RYNMARK, B. M. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1005, n. 2, p. 109–117, 1989.

TAGUCHI, R.; MINAMI, A.; MATSUDA, Y.; TAKAHASHI, T.; OTSUBO, T.; IKEDA, K.; SUZUKI, T. Preferential Accumulation of ¹⁴C-NGlycolylneuraminic Acid over ¹⁴C-NAcetylneuraminic Acid in the Rat Brain after Tail Vein Injection. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-11, 2015.

TANG, J.; RUTISHAUSER, U.; LANDMESSER, L. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. **Neuron**, v. 13, n. 2, p. 405-414, 1994.

TANGVORANUNTAKUL, P.; GAGNEUX, P.; DIAZ, S.; BARDOR, M.; VARKI, N.; VARKI, A.; MUCHMORE, E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 12045-12050, 2003.

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, n. 2, p. 235-241, 2009.

TYRRELL, L.; RENGANATHAN, M.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G. Glycosylation alters steady-state inactivation of sodium channel Nav1.9/NaN in dorsal root ganglion neurons and is developmentally regulated. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9629–9637, 2001.

UAUY, R.; MENA, P.; PEIRANO, P. Mechanisms for nutrient effects on brain development and cognition. **Nestlé Nutrition Workshop Series: Clinical and Performance Program**, v. 5, p. 41–70, 2001.

URASHIMA, T.; TAUFIK, E.; FUKUDA, K.; ASAKUMA, S. Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 3, p. 455-466, 2013.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, n. 2, p. 97–130, 1993.

VASCONCELOS, C.A.; DE OLIVEIRA, J.A.F.; DE OLIVEIRA COSTA L.A.; GUEDES, R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 163-170, 2004.

VIVERGE, D.; GRIMMONPREZ, L.; SOLERE, M. Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from goat (*Capra hircus*) milk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, n. 2, p. 157–164, 1997.

WANG, B.; BRAND-MILLER, J.; MCVEAGH, P.; PETOCZ, P. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 510–515, 2001a.

WANG, B.; BRAND-MILLER, J.; MCVEAGH, P.; PETOCZ, P. Brain sialic acid concentration: comparison of breast-fed vs formula-fed infants. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 10, 2001b, S-34p.

WANG, B.; BRAND-MILLE, J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 11, 1351–1369, 2003.

WANG, B.; MCVEAGH, P.; PETOCZ, P.; BRAND-MILLER, J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 5, p. 1024–1029, 2003.

WANG, B.; MILLER, J. B.; MCNEIL, Y.; MCVEAGH, P. Sialic acid concentration of brain gangliosides: variation among eight mammalian species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 119, n. 1, p. 435–439, 1998.

WANG, B. Molecular Mechanism Underlying Sialic Acid as an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. **Advances in Nutrition**, v. 3, n.3, p. 465–472, 2012.

WANG, B.; YU, B.; KARIM, M.; HU, M.; SUN, Y.; MCGREEVY, P.; PETOCZ, P.; HELD, S.; BRAND-MILLER, J. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 561–569, 2007.

WIELGAT, P.; BRASZKO, J. J. The participation of sialic acids in microglia–neuron interactions. **Cellular Immunology**, v. 273, n. 1, p. 17–22, 2012.

WU, Y.; SHAO, Z.; GAO, W.; LI, H.; XU, M. Relationship between the level of sialic acid during perinatal period and early intelligence development of full term infants. **Zhonghua Er Ke Za Zhi. Chinese Journal of Pediatrics**. v. 52, n. 2, p. 107–111, 2014.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R.C.A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 12, p. 1277–1281, 1991.

YADAV, J. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 756–774, 2015.

YOO, S. W.; MOTARI, M. G.; SUSUKI, K.; PRENDERGAST, J.; MOUNTNEY, A.; HURTADO, A.; SCHNAAR, R. L. Sialylation regulates brain structure and function. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 3040-3053, 2105.

ZUPANC, M. L.; LEGROS, B. Progressive myoclonic epilepsy. **Cerebellum**. v. 3, n. 3, p. 156-71, 2004.

ANEXO

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, 08 de maio de 2015

Ofício nº 43/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araujo Guedes**
Departamento de Nutrição - CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.041458/2014-44

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, "**Ácido siálico do leite caprino e desenvolvimento neural: análise eletrofisiológica e comportamental em ratos albinos**".

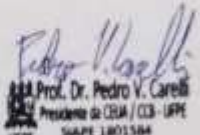
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

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

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

Origem dos animais: biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 35-45 dias; Peso: 100g; Sexo: machos; Nº total de animais: 80.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB - UFPE
 UFPE SUAPE 1801504

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO – B - Confirmação da submissão do artigo ao periódico

Your submission NNS669



Editorial Office, Nutritional Neuroscience

05/05/2016

Você ▾

↩ Responder | ▾

Dear Larissa

Your submission "Neonatal administration of goat whey modulates memory and cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes: possible role of sialic acid" to Nutritional Neuroscience has been assigned the manuscript number: NNS669.

The paper is now with an Editor and we will contact you again once referees' comments are received. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://nns.edmgr.com/>.

Your username is: larissabrito23

Your password is: available at this link [http://nns.edmgr.com/Default.aspx?](http://nns.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Larissa&lastname=Medeiros&email_address=larissabrito_23@hotmail.com)

[pg=accountFinder.aspx&firstname=Larissa&lastname=Medeiros&email_address=larissabrito_23@hotmail.com](http://nns.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Larissa&lastname=Medeiros&email_address=larissabrito_23@hotmail.com)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards

Byron C. Jones, Ph.D.
Editor-in-Chief
Nutritional Neuroscience