



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

AUREA LETÍCIA GOMES DA SILVA

**TREINAMENTO FÍSICO E QUERCETINA: EFEITOS SOBRE A
EXCITABILIDADE CEREBRAL EM RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE POR
CONTENÇÃO**

Recife

2023

AUREA LETÍCIA GOMES DA SILVA

**TREINAMENTO FÍSICO E QUERCETINA: EFEITOS SOBRE A
EXCITABILIDADE CEREBRAL EM RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE POR
CONTENÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Bases experimentais da Nutrição.

Orientadora: Dr.^a Ângela Amâncio dos Santos

Coorientadora: Dr.^a Anna Myrna Jaguaribe de Lima

Recife

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

S586t	<p>Silva, Aurea Letícia Gomes da Treinamento físico e quercetina: efeitos sobre a excitabilidade cerebral em ratos submetidos a estresse por contenção / Aurea Letícia Gomes da Silva . – 2023. 50 p. : il.</p> <p>Orientadora: Ângela Amâncio dos Santos. Coorientadora: Anna Myrna Jaguaribe de Lima. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2023.</p> <p>Inclui referências e anexo.</p> <p>1. Estresse fisiológico. 2. Exercício físico. 3. Quercetina. 4. Depressão alastrante da atividade elétrica cortical. I. Santos, Ângela Amâncio dos (orientadora). II. Lima, Anna Myrna Jaguaribe de (coorientadora). III. Título.</p> <p>612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 154)</p>
-------	--

AUREA LETÍCIA GOMES DA SILVA

**TREINAMENTO FÍSICO E QUERCETINA: EFEITOS SOBRE A
EXCITABILIDADE CEREBRAL EM RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE POR
CONTENÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Bases experimentais da Nutrição.

Aprovado em: 24/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diogo Antônio Alves de Vasconcelos (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Examinador externo ao programa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr^a. Monara Kaélle Cruz Angelim (Examinador Externo à Instituição)
Universidade de Campinas - UNICAMP

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, minha família, minhas orientadoras, todos os colegas de laboratório, e aos que contribuíram para a conclusão dessa etapa profissional.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus, por ter me colocado nessa etapa profissional e ter me sustentado em cada detalhe com seu imenso amor. Não posso deixar de citar um trecho bíblico que me acompanhou nesses dois anos, que se encontra em Salmos 91:1-2 “Aquele que habita no abrigo do Altíssimo e descansa à sombra do Todo-poderoso pode dizer ao Senhor: Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza, o meu Deus, em quem confio”. É gratificante ser sustentada por um Deus tão maravilhoso, justo e fiel. A honra e a glória são somente de Deus, que sempre derramou muita força e determinação para chegar até aqui.

Além de Deus, quero agradecer a duas profissionais incríveis e especiais que sempre me ajudaram da melhor forma possível, que são minha orientadora Dr^a Ângela Amâncio dos Santos e minha coorientadora Dr^a Anna Myrna Jaguaribe de Lima. Agradeço por tudo que fizeram/fazem por mim e por termos uma relação tão respeitosa, com muita empatia e parceria. Sem dúvidas meu crescimento profissional tem a colaboração de ambas.

Quero agradecer de todo o meu coração a minha amada família, em especial meus pais, Adelmiro Gomes da Silva e Maria Da Paz Gomes da Silva, a minha irmã Luana Maria Gomes da Silva e meu cunhado Geomar Júnior. Todos sempre acreditaram no poder da educação e não mediram esforços para me ajudar em todos os momentos. Sem dúvidas uma família que entende o valor da educação e da ciência faz toda a diferença.

Agradeço também aos amigos que fiz ao longo dessa etapa, em especial a todos os alunos do Laboratório de Eletro-neurofisiologia (LABEN), em especial ao meu colaborador Roberto Carlos da Silva Bandeira, juntos conseguimos desenvolver esse trabalho. Também agradeço a minhas colegas de bases experimentais.

Agradeço aos amigos que mesmo de longe, torciam, apoiavam e oravam por mim. Em especial minhas duas amigas da graduação Nathalia Fernanda e Maria Gabriela e minha amiga desde a escola Wellane Medrado. Agradeço ao meu professor de inglês Manoel Tavares por ajudar nessa etapa. Por fim, não posso deixar de agradecer a todos os professores, servidores e profissionais que fazem a Universidade Federal de Pernambuco ser uma das melhores Universidades públicas do País e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

O estresse é uma resposta do organismo a estímulos que podem representar circunstâncias ameaçadoras. Em contrapartida, o treinamento físico e a ingestão de antioxidantes como a quercetina promovem benefícios à saúde, inclusive pela redução dos níveis de estresse. Entretanto, a eficácia dessas estratégias em aperfeiçoar especificamente a eletrofisiologia do cérebro precisa ser melhor entendida. O objetivo deste trabalho foi avaliar em ratos, submetidos a estresse por contenção, os efeitos do treinamento aeróbio de intensidade moderada e da suplementação com quercetina sobre a atividade elétrica cerebral. Ratos machos, da linhagem *Wistar*, formaram os seguintes grupos: Controle (GC; n = 12), Contenção (C; n= 15), Contenção + Treinamento moderado (C+TM; n = 12), Contenção + 8 dias de Quercetina (C+8Q; n= 11), Contenção + 15 dias de Quercetina (C+15Q; n = 11). Uma dose diária de quercetina (150 mg/kg/dia, v.o.) foi administrada no período descrito acima. O exercício moderado foi realizado em esteira motorizada (Insight EP-131) por três semanas, sendo 5 sessões semanais (uma sessão por dia), com duração de 30 minutos. A excitabilidade cerebral foi medida através da depressão alastrante cortical (DAC), que foi provocada no córtex cerebral, aplicando-se o estímulo (solução de KCl a 2%), durante um minuto. A variação lenta de voltagem que acompanha a DAC foi registrada e gravada por quatro horas, utilizando-se um sistema digital (EMG systems). O estresse por contenção reduziu a velocidade de propagação da DAC ($2,38 \pm 0,29$ mm/min) em comparação com o grupo controle ($3,58 \pm 0,4$ mm/min). Porém, o treinamento em esteira ($2,95 \pm 0,28$ mm/min), e a suplementação com quercetina durante 15 dias ($3,13 \pm 0,55$ mm/min) aumentaram significativamente a velocidade de propagação da DAC nos animais estressados. Nossos achados sugerem que a quercetina e o treinamento físico restabelecem os padrões da atividade elétrica cerebral em ratos que sofreram estresse por contenção.

Palavras-chaves: estresse fisiológico; exercício físico; quercetina; depressão alastrante da atividade elétrica cortical.

ABSTRACT

Stress is the body's response to stimuli that can represent threatening circumstances. On the other hand, physical training, and the intake of antioxidants such as quercetin promote health benefits, including the reduction of stress levels. However, the effectiveness of these strategies in improving brain electrophysiological activity needs to be further investigated. The objective of this work was to evaluate in rats submitted to stress by restraint, the effects of moderate-intensity aerobic training and quercetin supplementation on brain electrical activity. Male Wistar rats formed the following groups: Control (CG; n = 12), Restraint (R; n= 15), Restraint + moderate training (R+MT; n = 12), Restraint + 8 days of Quercetin (R+8Q; n=11), Restraint + 15 days of Quercetin (R+15Q; n=11). A daily dose of quercetin (150 mg/kg/day, by gavage) was administered for the period described above. Moderate exercise was performed on a motorized treadmill (Insight EP-131) for three weeks, with 5 weekly sessions (one session per day), lasting 30 minutes. Cerebral excitability was measured through cortical spreading depression, which was provoked in the region of the cerebral cortex by applying the stimulus (2% KCl solution) for one minute. The slow voltage variation that accompanies the CSD was recorded and recorded using a digital system (EMG systems) for four hours. Restraint stress reduced the velocities of CSD propagation (2.38 ± 0.29 mm/min) compared to the control group (3.58 ± 0.4 mm/min). However, treadmill training (2.95 ± 0.28 mm/min), and quercetin supplementation for 15 days (3.13 ± 0.55 mm/min) significantly increased the velocities of propagation of CSD in stressed animals. Our findings showed that quercetin and physical training have a protective effect on the electrical brain activity of rats that suffered stress by restraint.

Keywords: stress, physiological; exercise; quercetin; cortical spreading depression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular de um flavonoide, do glicosídeo de quercetina e da quercetina.....	21
Figura 2- Grupos experimentais.....	26
Figura 3- Linha do tempo do delineamento experimental.....	29
Figura 4- Evolução ponderal dos animais experimentais.....	31
Figura 5- Registros de depressão alastrante cortical representativos dos diferentes grupos experimentais.....	32
Figura 6- Velocidade da depressão alastrante cortical nos diferentes grupos experimentais.....	33
Figura 7- Amplitude da depressão alastrante cortical nos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 8- Duração da depressão alastrante cortical nos diferentes grupos experimentais.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-AgCl	Prata-cloreto de prata
ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
C	Contenção
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C+TM	Contenção + Treinamento físico
C+ 8Q	Contenção + 8 dias de quercetina
C+ 15Q	Contenção + 15 dias de quercetina
DAC	Depressão Alastrante Cortical
Dp	Desvio padrão
EEG	Eletroencefalograma
FADH2	Flavina adenina nucleotídeo reduzido
GC	Grupo controle
LABEN	Laboratório de Eletroneurofisiologia
KCl	Cloreto de potássio
Nrf2-ARE	Fator nuclear derivado de eritróide 2
PON2	Paraoxonase 2
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT7	Sirtuína 7
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
v.o.	Via orogástrica
SN	Sistema nervoso
TF	Treinamento físico
VLV	Varição lenta de voltagem
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3	HIPÓTESES.....	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	OBJETIVO GERAL.....	25
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1	ANIMAIS.....	26
5.2	ALOCAÇÃO DOS GRUPOS.....	26
5.3	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	27
5.4	PROTOCOLO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA.....	27
5.5	ESTRESSE POR CONTENÇÃO.....	28
5.6	PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.....	28
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL.....	28
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6	RESULTADOS	30
6.1	PESO CORPORAL.....	30
6.2	DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL.....	31
7	DISCUSSÃO.....	35
8	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
	(CEUA) DA UFPE.....	50

1 INTRODUÇÃO

O estresse pode ser definido como uma resposta do corpo a condições adversas que o organismo enfrenta. Dependendo da sua intensidade e duração, o estresse pode causar efeitos deletérios à saúde e conseqüentemente prejudicar a qualidade de vida (SADIR, BIGNOTTO & LIPP, 2010). À medida que o corpo enfrenta a condição de estresse, conseqüentemente aciona alguns sistemas no organismo como o sistema nervoso (SN) (DRAGOS & TĂNĂSESCU, 2010).

Uma das alternativas para reduzir os efeitos deletérios à saúde, ocasionados pelo estresse, é a realização de treinamento físico (TF) (FERRO *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2020). O TF melhora a qualidade de vida por promover benefícios na qualidade do sono, aumentar a autoestima e a sensação de bem-estar, prevenir doenças crônicas, manter a integridade do cérebro, e, conseqüentemente, melhorar as funções cognitivas, promovendo a neurogênese, aumentando a disponibilidade de oxigênio no cérebro, e reduzindo a excitabilidade cerebral (MELLO, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2011; MEREGE FILHO *et al.*, 2014).

Além do TF, existem outras estratégias que podem beneficiar a saúde na condição de estresse, como o uso de antioxidantes exógenos, como a quercetina. Este flavonoide polifenólico possui um alto poder antioxidante e anti-inflamatório e é encontrado amplamente na dieta em diversas fontes vegetais como frutas cítricas, cebola, alface, brócolis, tomate. Em países asiáticos como a china, esse composto bioativo é bastante utilizado na medicina tradicional devido a sua potente ação em inflamações e no estresse oxidativo (HARWOOD *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019; National Center for Biotechnology Information, 2020).

Dessa forma, a respeito da ação da quercetina no organismo, ela pode atuar na prevenção de várias doenças como doença cardiovascular, diabetes, osteoporose e vários tipos de cânceres (DAVIS *et al.*, 2003; HARWOOD *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019). Especificamente no sistema nervoso, possui efeitos neuroprotetores e psicoestimulantes, podendo também estimular o processo de autofagia para remover organelas danificadas que tendem a se acumular em neurônios (COSTA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019). Antioxidantes podem minimizar os efeitos adversos de doenças neurodegenerativas como a epilepsia.

Assim, a quercetina poderia atenuar esses danos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DAVIS *et al.*, 2009).

Portanto, o estresse, o treinamento físico e a ingestão de compostos antioxidantes são condições que podem afetar a atividade elétrica cerebral. Nesse trabalho, utilizamos o método da depressão alastrante cortical (DAC) para avaliar a atividade elétrica cerebral no córtex de animais estressados, por ser um método amplamente utilizado pela sua eficácia e reprodutibilidade. A DAC foi descrita inicialmente, na década de 40, pelo pesquisador Doutor Aristides Azevedo Pacheco Leão, que observou uma depressão profunda e provisória da atividade elétrica do tecido cortical após estímulos locais, que de forma inicial, aconteceu no local estimulado, mas que se propagava como uma onda em várias direções (LEÃO, 1944; LEÃO, 1947; MARANHÃO-FILHO, 1996).

A onda que acompanha a DAC, apresenta uma velocidade em cerca de 3 mm/min e depende muito das condições do tecido cortical para se propagar. Para o surgimento da onda, o que ocorre tanto nos neurônios, como nas células da glia, é um processo fisiológico conhecido como despolarização. A despolarização, acontece devido ao aumento da permeabilidade das membranas celulares ao fluxo de íons, promovendo a saída de K^+ e entrada de Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ e água. A entrada de água no meio intracelular, ocasiona a redução do espaço extracelular (LEÃO, 1944; LEÃO, 1947; MARANHÃO-FILHO, 1996).

No que diz respeito ao potencial elétrico extracelular do córtex, varia quanto a sua amplitude, cerca de 10-30 mV e duração 0,5-1 minuto. Essas variações são consideradas maiores quando comparadas as variações de eletrocorticogramas tradicionais. Após o processo de despolarização, ocorre o período refratário absoluto de 1-2 minutos, restaurando o eletrocorticograma (LEÃO, 1944; LEÃO, 1947; MARANHÃO-FILHO, 1996). É válido destacar que existe uma associação entre a DAC e algumas patologias como isquemia cerebral, epilepsia e migrânea com aura, e até o presente momento, esse é o primeiro trabalho que avalia o estresse e alternativas que minimizem os efeitos deletérios na atividade eletrofisiológica pelo método da DAC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTRESSE

O estresse é uma condição biológica que pode ser definida como uma resposta do corpo diante de fatores internos ou externos que o organismo precisa lidar. As reações do corpo ao estresse, ou até mesmo à sua duração, promovem alterações biológicas na homeostase, no sistema imunológico, no sistema endócrino e no sistema nervoso (SN) (DRAGOS & TĂNĂSESCU, 2010; YARIBEYGI *et al.*, 2017). De maneira geral, o cérebro responde à ameaça do agente estressor através de uma resposta endócrina, que é ativada pelo sistema nervoso simpático, e que tem como finalidade a liberação de glicocorticoides (ANDERSON *et al.*, 2019).

Essa resposta endócrina, é iniciada com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, que ativa a liberação do hormônio liberador de corticotrofina e da vasopressina, pelo hipotálamo, através de influências que podem ser nervosas, neuroendócrinas e comportamentais. O hormônio liberador de corticotrofina e a vasopressina, por sua vez, estimulam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico pela pituitária, que por fim ativa a secreção de glicocorticoides pelo córtex adrenal. O principal glicocorticoide que aumenta na condição de estresse em humanos é o cortisol, e em roedores é a corticosterona. Esses hormônios através do sangue podem atingir todos os órgãos, e conseqüentemente ultrapassar a barreira hematoencefálica e atingir o SN (DRAGOS & TĂNĂSESCU, 2010; ANDERSON *et al.*, 2019).

O estresse, por sua vez, pode ser classificado em físico, psicológico, agudo ou crônico. No que diz respeito ao estresse físico, este ocorre à medida que o agente estressor afeta diretamente o organismo, que pode ser através de infecções e exercícios físicos excessivos. O estresse psicológico ocorre através da ativação do sistema nervoso central por meios cognitivos, como enfrentar a perda de um familiar, jornadas intensas de trabalho, ansiedade e depressão (DRAGOS & TĂNĂSESCU, 2010; SADIR *et al.*, 2010).

Na pesquisa experimental, existem alguns modelos, que permitem provocar o estresse de forma física, psicológica ou a junção de ambas. Assim, o agente estressor pode ser a contenção, que tem como finalidade restringir os movimentos dos animais, que reflete em um estresse psicológico, porém apresentando características físicas como uma leve hipoxia e aumento da temperatura corporal (NAIR *et al.*, 2021; KUTI *et*

al., 2022). A contenção pode ser do tipo prolongada, realizada a noite, horário ativo dos roedores, resultando em um estresse psicológico prolongado, com duração de 12 ou 15 horas. A contenção também pode ser, do tipo repetida, no qual ocorre a contenção diária no mesmo horário (por exemplo, 09:00- 10:00) durante 21 dias, promovendo a redução gradual da atividade neural e a liberação de glicocorticoides (DING *et al.*,2021; NAIR *et al.*,2021; KUTI *et al.*, 2022).

Além do estresse por contenção, existe o estresse variável crônico, que minimiza a habituação aos protocolos descritos anteriormente, por aplicar agentes estressores diferentes e de forma inesperada, os animais são submetidos a agentes estressores diurnos e noturnos durante 21 dias. Os estressores diurnos são realizados de forma breve e randomizados para serem realizados entre 08:00 e 18:00, pode ser feito através do nado forçado, exposição ao frio, contenção, agitação da gaiola. Já os estressores noturnos, também são randomizados, porém realizados entre 17:00 e 19:00 horas e encerrados entre 08:00 e 10:00 horas do dia seguinte, pode ser feito através da maravalha molhada, inclinação da gaiola entre 30° a 45 ° graus, luzes acessas a noite, privação de água e comida (DING *et al.*,2021; YAMAUCHI *et al.*, 2022).

Diante desses agentes estressores que podem ser físicos ou psicológicos, o organismo pode reagir de forma aguda ou crônica. A resposta fisiológica ao estresse agudo acontece de forma mais intensa, porém de curta duração, em geral, ela promove resistência a processos infecciosos, sendo, conseqüentemente, benéfica ao corpo. Já a reação crônica se caracteriza por ser persistente e pode ocasionar efeitos deletérios a saúde (DRAGOS & TĂNĂSESCU, 2010; SADIR *et al.*, 2010).

A princípio, quando o organismo precisa lidar com uma situação estressante, por uma função adaptativa na evolução, um dos sistemas que atuam para combater o agente estressor, é o sistema nervoso. Mas vale ressaltar que o estresse persistente, acaba trazendo danos a muitas funções cerebrais. A década de 60 portanto, foi marcada pela hipótese de que as funções cerebrais podem ser modificadas sob a condição de estresse (MCEWEN *et al.*, 1968; DE KLOET *et al.*, 1999). Diante dessa descoberta, foi possível identificar que o hipocampo e outras regiões cerebrais possuem afinidade com os glicocorticoides liberados em resposta ao estresse. Essa afinidade é possível através dos receptores corticotrópicos, que são os

glicocorticosteróides e mineralocorticoides presentes em algumas regiões do sistema nervoso (MCEWEN *et al.*, 1968; DE KLOET *et al.*, 1999; YARIBEYGI *et al.*, 2017).

No que diz respeito as interferências do estresse no SN, elas podem ocorrer através do estresse oxidativo, o qual está associado ao estresse crônico. Sabe-se que o cérebro é rico em lipídios, consome muita energia e não possui uma boa capacidade antioxidante, sendo, portanto, vulnerável a danos oxidativos (HULBERT *et al.*, 2007; SALIM, 2017). O estresse oxidativo consiste em um excesso na produção de radicais livres e uma falta de resposta do sistema antioxidante para neutralização, comprometendo, portanto, a bioquímica do cérebro. É importante destacar que, em doses baixas ou até mesmo moderadas, os radicais livres são considerados indispensáveis para a função neuronal e para o seu desenvolvimento (HULBERT *et al.*, 2007; SALIM, 2017).

Essa interferência pelo estresse oxidativo é proveniente de uma vasta oxidação proteica e da peroxidação de lipídios, ocasionando a degeneração celular e a redução da atividade funcional. Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo é caracterizado como um fenômeno de autopropagação, que consiste na capacidade das macromoléculas prejudicadas pelo excesso de radicais serem capazes de agir ou se transformar em radicais livres (HULBERT *et al.*, 2007; SALIM, 2017). O estresse oxidativo é uma condição que precisa ser considerada nos processos patológicos de doenças neurodegenerativas, ele expõe o cérebro à ação de substâncias químicas de alta toxicidade (neurotóxicos), que dificultam o funcionamento adequado do sistema nervoso (HULBERT *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2016; SALIM, 2017).

Dentre as alterações que acontecem no sistema nervoso, o estresse pode proporcionar mudanças no funcionamento dos sistemas de neurotransmissores, como o aumento na liberação do glutamato. Esse aumento na liberação do glutamato, pode ser desencadeado pelo aumento dos níveis de glicocorticoides, que proporcionam o aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular. O aumento de Ca^{2+} intracelular, ativa algumas vias de sinalização importantes como o aumento na liberação de glutamato, de radicais livres e da síntese e liberação de citocinas (BALI *et al.*, 2013; NOVAKOVA *et al.*, 2013). O influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular e o conseqüente aumento na liberação de glutamato, são fundamentais para a deflagração e propagação da DAC (LEÃO, 1944; LEÃO, 1947; MARANHÃO-FILHO, 1996).

Outras alterações são possíveis através da interação do estresse com doenças que afetam o SN, como a epilepsia. A epilepsia, por sua vez, pode ter o estresse como um gatilho para as crises epiléticas, além disso, lidar com essa doença crônica, pode desencadear o estresse. Através de pesquisas com animais, sabe-se que a exposição a agentes estressores na fase inicial da vida, repercute para o desenvolvimento da epilepsia na fase adulta e uma maior predisposição às crises convulsionantes que apresentam variações eletrofisiológicas e até na própria estrutura cerebral (KOE *et al.*, 2009; PONNUSAMY *et al.*, 2012, NOVAKOVA *et al.*, 2013).

Outras alterações são possíveis de ocorrer em alguns processos como nos mecanismos de plasticidade do cérebro, na neurogênese, na proliferação celular, nas sinalizações sinápticas. Esses processos são fundamentais para garantir que o sistema nervoso mantenha sua estrutura e funcionabilidade ao longo da vida (HULBERT *et al.*, 2007; SALIM, 2017). Dessa forma, sabe-se que existe uma associação da DAC e algumas patologias como a migrânea e a epilepsia, no entanto, é necessário explorar os mecanismos de atuação do estresse na excitabilidade neural.

2.2 ESTRESSE E TREINAMENTO FÍSICO

O TF pode ser definido como uma movimentação corporal feita com regularidade, de forma idealizada e estruturada e que tenha como finalidade o aperfeiçoamento da aptidão física. Diferente do TF, a atividade física consiste em qualquer mobilidade corporal que promove a contração muscular e conseqüentemente produz um saldo energético, como uma rotina de serviços domésticos, subir e descer escadas, caminhar de um determinado lugar para o outro (SANTA-CLARA *et al.*, 2015).

A execução do TF portanto considera, pelo menos, duas variáveis principais, a intensidade (carga de exercício) e o volume (quantidade de trabalho realizado em cada treino). Esses dois fatores são essenciais nas adaptações morfológicas e funcionais do corpo, que podem ocorrer de forma aguda ou crônica, como também podem variar de acordo com o programa de treinamento (KURA & FILHO, 2011; EGAN & ZIERATH, 2013; JOYNER M.J & DEMPSEY, 2018; CATANHO, 2019).

Dessa forma, há o treinamento de força ou potência, que promove aumento da força e da potência da musculatura; bem como, hipertrofia muscular. A execução desse tipo de treinamento ocorre por um curto período e contra uma carga alta. O treinamento de força pode ser realizado através do supino, em que o corpo fica na

posição supina ou decúbito dorsal, para o levantamento de barra. Também pode ser realizado através do levantamento de peso olímpico (arranco: o levantamento da barra acima da cabeça ocorre em um único movimento, sem apoiá-la no corpo; arremesso: a barra é erguida acima dos ombros e pode ser apoiada na região peitoral, utilizando a força dos braços e pernas para levantar o peso acima da cabeça) (TIDBALL, 2005; MACINNIS & GIBALA, 2017; HUGHES *et al.*,2018; CATANHO, 2019).

O treinamento também pode ser intervalado, que combina o intervalo de exercícios intensos com períodos de recuperação. Esse método é dividido em treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), em que os esforços realizados correspondem de 85-95% da frequência cardíaca máxima, e treinamento intervalado de sprint (SIT) em que os esforços executados são em intensidade iguais ou até maiores do que o ritmo que promove o Vo2pico. O Vo2pico, consiste na maior taxa de consumo de oxigênio durante o exercício máximo ou até mesmo exaustivo (TIDBALL, 2005; MACINNIS & GIBALA, 2017; HUGHES *et al.*,2018; CATANHO, 2019).

Outra forma de TF pode ser o treinamento de *endurance* ou aeróbio, que consiste na capacidade física de tolerar a fadiga diante de um grande esforço. Esse tipo de treinamento é executado por um período extenso, mas contra uma carga considerada relativamente baixa. Ele promove melhora no metabolismo energético aeróbio, aumentando o débito cardíaco e o consumo máximo de oxigênio, exemplos desse tipo de treinamento são natação, corrida, ciclismo (EGAN & ZIERATH, 2013; MACINNIS & GIBALA, 2017; HUGHES *et al.*,2018; CATANHO, 2019).

O treinamento aeróbio de alta intensidade beneficia o metabolismo, através da estimulação de vias intracelulares de sinalização que podem promover a angiogênese, a biogênese mitocondrial, aumento da densidade capilar, e o aumento na expressão e atividade de enzimas oxidativas (EGAN & ZIERATH, 2013; MACINNIS & GIBALA, 2017; HUGHES *et al.*,2018; CATANHO, 2019). Adicionalmente, protocolos de treinamento aeróbio com um maior volume de trabalho, mas realizado em intensidades leves ou moderadas, podem proporcionar melhora na sensibilidade à insulina, redução de riscos cardiovasculares e perda de peso em indivíduos obesos (EGAN & ZIERATH, 2013; MACINNIS & GIBALA, 2017; CATANHO, 2019).

Na pesquisa experimental, muitos benefícios também são descritos com protocolos de treinamento intervalado e treinamento aeróbio, como a prevenção da

perda de massa muscular esquelética relacionada ao acidente vascular cerebral (LUO *et al.*,2021). O treinamento aeróbico, principalmente os realizados em esteira também melhora propriedades ósseas e alivia a osteopenia em animais com osteoporose, melhora a qualidade das mitocôndrias no músculo esquelético, garantindo o fornecimento de energia, promove a angiogênese, melhora a sensibilidade a insulina, melhora as funções cognitivas, altera a expressão do gene/receptor relacionado à dopamina (GUO *et al.*,2020).

No que diz respeito às adaptações fisiológicas, elas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. As adaptações agudas são aquelas relacionadas diretamente à realização de uma determinada sessão de treinamento, podendo gerar respostas instantâneas, como o aumento da temperatura corporal e da frequência cardíaca. As respostas tardias podem ser observadas desde as primeiras 24 horas até 72 horas após o treinamento, como exemplo, a redução da resistência dos vasos sanguíneos (KURA & FILHO, 2011; JOYNER M.J & DEMPSEY, 2018).

As adaptações crônicas são ocasionadas através de sessões planejadas e estruturadas de TF, além de prevenir e controlar doenças crônicas, como diabetes e hipertensão, essas adaptações podem recuperar as funções motoras de indivíduos que sofreram algum tipo de doença como o acidente vascular cerebral, promove a redução dos níveis de estresse e, de forma geral, melhorar a aptidão cardiorrespiratória. Uma vez, que as adaptações crônicas são alcançadas é possível identificar facilmente um indivíduo treinado de outro destreinado (MELLO, 2005; KURA & FILHO, 2011; JOYNER M.J & DEMPSEY, 2018).

Diante de todas as vantagens que uma vida ativa pode proporcionar, é importante ressaltar que o TF pode representar um estresse físico, que é proveniente da diminuição do aporte de oxigênio para os tecidos, da produção excessiva de radicais livres, da hipertrofia e hiperplasia das células musculares (TIDBALL, 2005; MACINNIS & GIBALA, 2017; CATANHO, 2019). Porém, esse tipo de estresse promove alterações vantajosas ao organismo, pois proporciona ao corpo um processo de adaptação, e uma série de benefícios fisiológicos (PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000; MELLO, 2005).

Sobre os benefícios do TF ao sistema nervoso, ele pode atuar na plasticidade cerebral e sinalização sinápticas através do aumento da expressão do fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína pertencente a uma família de citocinas conhecida como neurotrofinas (COTMAN & BERCHTOLD, 2002; ADLARD & COTMAN, 2004; MATTSON, 2004; AGUIAR *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que o TF é capaz de aumentar a expressão de BDNF em regiões críticas do cérebro, como o hipocampo, exercendo efeito protetor, mesmo na vigência de um estresse leve (ADLARD & COTMAN, 2004). O TF pode melhorar o desempenho cognitivo, como também impulsionar a neurogênese e aumentar a disponibilidade de oxigênio no cérebro (COTMAN & BERCHTOLD, 2002; ADLARD & COTMAN, 2004; MELLO, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2011; MEREGE FILHO *et al.*, 2014).

Além disso, o TF pode modular a síntese e liberação de neurotransmissores, aumentar o fluxo sanguíneo no cérebro, atenuar os efeitos negativos como na cognição de pacientes com doenças neurodegenerativas, reduzir a frequência de episódios de migrânea e reduzir a excitabilidade cerebral (MELLO, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2011; MEREGE FILHO *et al.*, 2014; HANSSEN *et al.*, 2018). No que diz respeito a redução na frequência de migrânea, o estudo de Hanssen *et al.*, 2018, identificou que quanto maior foi a intensidade do TF, maior é a dilatação arteriolar retiniana. Esse aumento na dilatação das artérias da retina, permite um maior fluxo sanguíneo e conseqüentemente uma redução na frequência de migrânea. É importante evidenciar que a DAC é considerada um dos mecanismos de patogênese dos episódios de migrânea e que mudanças nos vasos cerebrais são indispensáveis para deflagrar a DAC.

Acerca da TF na excitabilidade cerebral, vários trabalhos utilizando o treinamento em esteira, tem demonstrado a eficácia do TF na excitabilidade cerebral (VITOR-DE-LIMA *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2020; VITOR-DE-LIMA *et al.*, 2023). Um dos mecanismos que pode explicar essa eficácia, seria o aumento da atividade serotoninérgica. O aumento da serotonina, é proveniente da diferença na relação entre o triptofano e os aminoácidos de cadeia ramificada no sangue e a conseqüente contribuição para que o triptofano ultrapasse a barreira hematoencefálica. Ao atravessar a barreira hematoencefálica, o triptofano, promove a produção de serotonina nos neurônios. Essa maior produção de serotonina por sua vez, possui um efeito antagônico na DAC, ou seja, quanto maior a disponibilidade de serotonina na região cerebral, menor a velocidade de propagação da DAC (BLOMSTRAND E, 2001; GUEDES *et al.*, 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2011).

Todas essas ações indicam que o TF atua como uma barreira protetora no sistema nervoso, mantendo suas funções habituais e reduzindo os prováveis prejuízos neurais provocados pela condição de estresse.

2.3 ESTRESSE E QUERCETINA

O excesso de radicais livres e a incapacidade do corpo no processo de neutralização ocasiona o estresse oxidativo. Por sua vez, o estresse oxidativo possui associação com o estresse crônico e a quantidade exacerbada de radicais livres é prejudicial às funções usais do sistema nervoso, e pode afetar a sua atividade eletrofisiológica (HULBERT *et al.*, 2007). Uma alternativa no controle do excesso de radicais livres, além do TF, é a ingestão de antioxidantes exógenos como a quercetina (3,3',4',5,7- pentahidroxi flavona) um potente antioxidante e o principal flavonoide encontrado na dieta humana. O nome quercetina é dado à forma aglicona, ou seja, a estrutura química que não possui o açúcar anexado, porém, com a ligação de um açúcar à molécula, que pode ser uma glicose, é formado um glicosídeo de quercetina, que é a forma mais consumida e presente nos alimentos (COSTA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2019).

Os flavonoides representam uma classe de compostos fenólicos que diferem um do outro por características específicas e pela estrutura química, são considerados metabólitos secundários de plantas, proveniente de um anel benzopirona (ULLAH *et al.*, 2020). A estrutura básica de um flavonoide consiste em um esqueleto de difenil propano com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (Figura 1) (LI *et al.*, 2016). Assim, dependendo da oxidação do anel de carbono, do grau de insaturação, e da estrutura química, os flavonoides se subdividem em flavonóis, flavanonas, flavonas, antocianinas, isoflavonoides, antoxantinas (flavanona e flavonol), chalconas (ULLAH *et al.*, 2020). Por ser o principal flavonoide presente na dieta, podemos encontrar a quercetina em diversos vegetais como maçã, uva, cereja, brócolis, cebola, tomate, alface, em bebidas como vinho e chá preto, e em sementes como nozes (LI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2019).

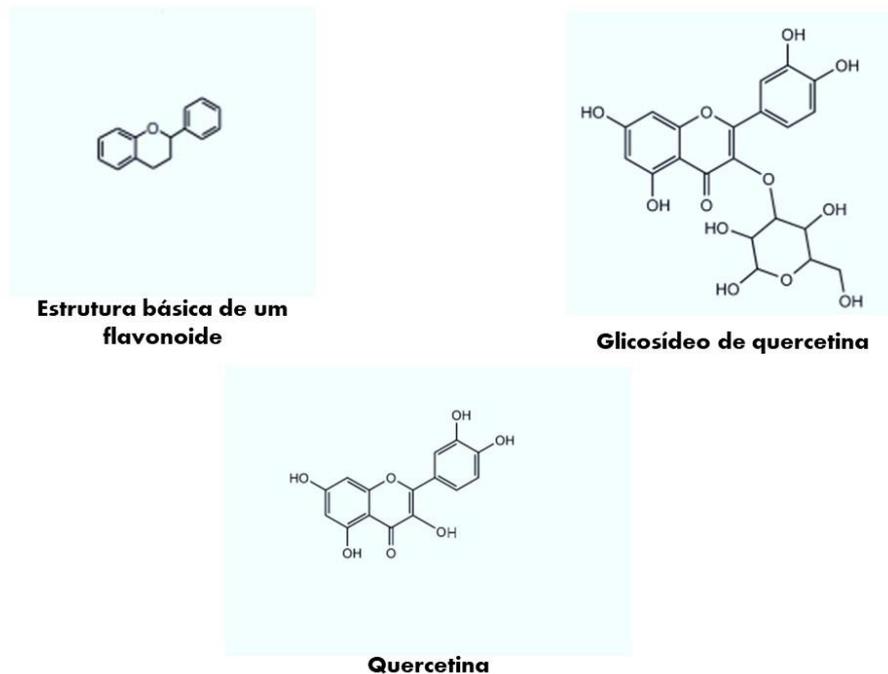


Figura 1: Estrutura molecular de um flavonoide, do glicosídeo de quercetina e da quercetina. Fonte: Adaptado de Ullah et al. (2020)

No que diz respeito a absorção da quercetina, o que vai diferir é o tipo de açúcar que está anexado na molécula, a administração conjunta de componentes da dieta como fibras e gorduras e a matriz alimentar em que a quercetina é consumida. De forma geral, a absorção se inicia com o processo de hidrólise dos glicosídeos de quercetina no intestino delgado, pela lactase florizina hidrolase, uma beta-glicosidase. A hidrólise da quercetina também pode ocorrer através da beta-glicosidase proveniente da microbiota intestinal, transformando-a na forma aglicona, que é absorvida (COSTA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2019).

Após o processo de absorção, a quercetina passa por processos de transporte e transformação, no qual alguns órgãos como fígado, rins, intestino delgado e a região do cólon do intestino participam dessa etapa. O que vai ocorrer nessa fase é a ação de enzimas de biotransformação que transformam os glicosídeos de quercetina através da metilação em glicuronídeo e sulfato de quercetina, como também ocorre a formação de ácidos fenólicos. Por fim, ocorre o processo de excreção pelos rins e eliminação na urina, vale destacar, que os ácidos fenólicos são os compostos orgânicos com alto poder antioxidante (LI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2019).

O poder antioxidante da quercetina sobre o estresse oxidativo promove efeitos benéficos à saúde, muito semelhantes àqueles proporcionados pelo treinamento

físico, com efeitos sobre doenças inflamatórias, diabetes, doenças cardiovasculares e distúrbios do sistema nervoso (DAVIS *et al.*, 2009; MALKOV *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016). No que diz respeito, ao sistema nervoso, a quercetina consegue atravessar a barreira hematoencefálica e quando é formulada em nanopartículas lipídicas, a entrada no cérebro é facilitada (COSTA *et al.*, 2016).

Assim, a capacidade antioxidante da quercetina é derivada de dois farmacóforos presentes nas moléculas, que são o grupo OH na posição 3 e o grupo catecol no anel B, que conseguem neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, a quercetina e seus metabólitos podem atuar como um pró-oxidante; ou seja, agir no próprio sistema de defesa antioxidante da célula (DAVIS *et al.*, 2009; MALKOV *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016).

A quercetina pode atuar na modulação de algumas vias antioxidantes como na via do Nrf2-ARE [fator nuclear (derivado de eritróide 2)], o Nrf2 é muito relevante na defesa celular, pois regula enzimas do estresse oxidativo e conseqüentemente impede a morte celular (SAW *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016). Pode aumentar a expressão da Paraoxonase 2 (PON₂), enzima encontrada nas mitocôndrias de células do cérebro e com ação importante na aterosclerose e na neuroproteção (COSTA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de ação da quercetina no SN é através da indução da autofagia, processo de extrema importância para a integridade cerebral, no qual ocorre a remoção de proteínas mal dobradas, como também organelas danificadas que tendem a se acumular em neurônios (QU *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016). Além do mais, o efeito neuroprotetor da quercetina pode ser através das sirtuínas, que são classificadas em sete tipos que vão da SIRT1 a SIRT7, elas estão presentes em vários processos importantes no metabolismo, participando de vias moleculares e celulares. Assim, a proteção do cérebro pode ser através da SIRT1, que além de diferenciar células tronco, protege a célula de apoptose (LEYTON *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016).

Ainda referente ao SN, tem sido observado que a quercetina pode atenuar os danos neurais provocados pela epilepsia, devido a suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e exercer ações psicoestimulantes em nível cerebral (DAVIS *et al.*,

2009). A ação da quercetina na epilepsia, pode ser através da inibição da via da ferroptose que é mediada pelo Nrf2. A via da ferroptose é promissora para alvos terapêuticos, e assim a quercetina pode aliviar a apoptose celular induzida por crises convulsionantes pela inibição da via da ferroptose (Xie *et al.*, 2022). A respeito das ações psicoestimulantes, substâncias psicoestimulantes, em geral, inibem os receptores de adenosina no sistema nervoso central e induzem maior atividade do sistema dopaminérgico (DAVIS *et al.*, 2003; ALEXANDER, 2006; DAVIS *et al.*, 2009).

Diante do que tem sido descrito, há relatos de que os efeitos deletérios do estresse podem ser combatidos pela suplementação com antioxidantes e pelo treinamento físico. Contudo, ainda é preciso esclarecer a relação dessas variáveis (estresse, treinamento físico e antioxidantes) com o funcionamento do sistema nervoso, mais especificamente, o córtex cerebral, em condições adversas, o cérebro produz potenciais elétricos diferentes do que se pode observar convencionalmente nos eletroencefalogramas (EEG). Assim, através do método da DAC é possível fazer interferências se o tecido cortical se encontra alterado em sua estrutura/ atividade elétrica (GUEDES *et al.*, 2004).

3 HIPÓTESE

- O estresse por contenção prejudica a atividade elétrica cerebral de ratos.
- O treinamento físico aeróbio moderado ou a suplementação com quercetina restaura a atividade elétrica cerebral em ratos submetidos a estresse por contenção.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do treinamento aeróbio de intensidade moderada ou da suplementação com quercetina sobre a atividade elétrica cerebral de ratos *Wistar*, submetidos a estresse por contenção.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar a excitabilidade cortical e a evolução ponderal de ratos adultos submetidos às seguintes condições:

- Estresse por contenção;
- Estresse por contenção e treinamento físico em esteira;
- Estresse por contenção e suplementação com quercetina (150 mg/kg) por 8 dias;
- Estresse por contenção e suplementação com quercetina (150 mg/kg) por 15 dias.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos em condições padrão do biotério, em sala à temperatura de 22 ± 2 °C, submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o escuro iniciando às dezenove horas), com acesso livre à água e comida (dieta comercial). Os procedimentos experimentais foram realizados no período de janeiro a setembro de 2022 no Laboratório de Eletroneurofisiologia (LABEN) da Universidade Federal de Pernambuco após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFPE (registro nº. 0093/2021).

5.2 ALOCAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Aos 80 dias de idade, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (Figura 2).

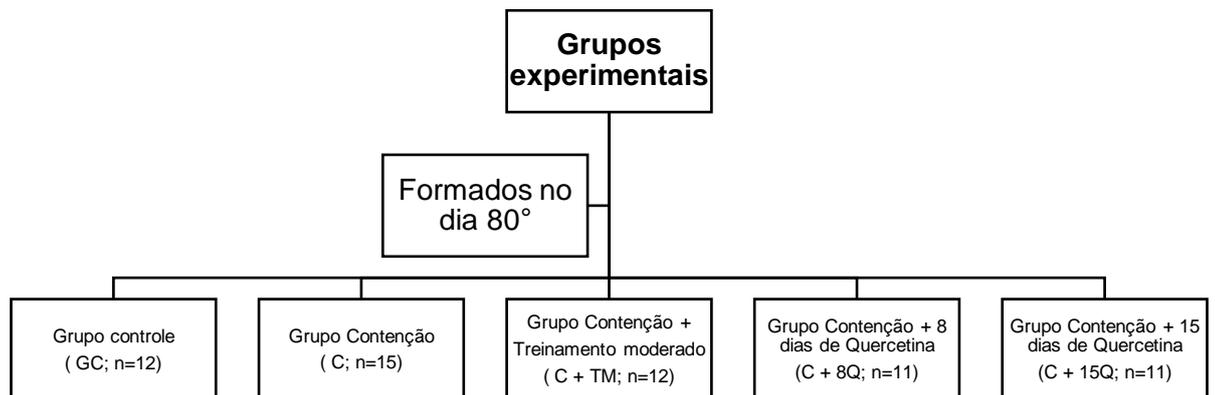


Figura 2. Grupos experimentais

- **Grupo controle (GC; n = 12)** – Constituem o controle negativo. Não sofreram estresse por contenção, nem foram submetidos a exercício físico ou suplementação com quercetina. Neste trabalho, o exercício foi realizado através de esteira

motorizada. Os animais deste grupo permaneceram na esteira, porém o equipamento foi mantido desligado. Assim, os ratos deste grupo foram submetidos ao mesmo ambiente que os demais animais.

- **Grupo contenção (C; n= 15)** – Os animais sofreram estresse por contenção, conforme apresentado mais adiante. Além disso, os ratos deste grupo foram tratados com o veículo utilizado para preparar a solução de quercetina (Tween 80 a 10% em solução salina; 1 mL, por gavagem). Os animais também foram mantidos na esteira desligada, de forma semelhante aos animais do GC.

- **Grupo Contenção + Treinamento moderado (C+TM; n = 12)** – Os ratos foram submetidos a estresse por contenção e a exercício moderado, conforme descrito abaixo. Além disso, os animais deste grupo foram tratados com o veículo utilizado para preparar a solução de quercetina, de forma semelhante ao grupo C.

- **Grupo contenção + 8 dias de Quercetina (C+8Q; n= 11)** – Os animais sofreram estresse por contenção e foram tratados com quercetina (150 mg/kg/dia, por gavagem) durante 8 dias (5 administrações semanais em uma semana e três administrações na outra semana). Além disso, os ratos também foram mantidos na esteira desligada, de forma semelhante ao grupo GC.

- **Grupo Contenção + 15 dias de Quercetina (C+15Q; n = 11)** – Os animais sofreram estresse por contenção e foram tratados com quercetina (150 mg/kg/dia, por gavagem) durante 15 dias (5 administrações semanais). Além disso, os ratos também foram mantidos na esteira desligada, de forma semelhante ao grupo GC.

5.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

O peso corporal de todos os animais foi aferido nos dias 80, 87, 94 e no dia do experimento através de balança analítica com precisão de 1 casa decimal.

5.4 PROTOCOLO DO TRATAMENTO COM QUERCETINA

A administração da quercetina (150 mg/kg/dia) foi feita de forma orogástrica (gavagem) entre entre 08:00 e 10:00 da manhã, durante 8 dias (5 administrações semanais em uma semana e três administrações na outra semana) e 15 dias (5

administrações semanais). A quercetina foi diluída em solução Tween 80 a 10% em solução salina e administrada (TSAO *et al.*, 2022).

5.5 ESTRESSE POR CONTENÇÃO

O estresse por contenção foi realizado conforme o protocolo de Zhang e Rosenkranz (2013). A partir do 87º dia de vida, os ratos dos grupos C, C+TM, C+8Q e C+ 15Q foram mantidos durante 20 minutos, em um contensor. O instrumento de contenção foi confeccionado no próprio laboratório e consiste em duas malhas metálicas, nas quais os animais foram contidos; os ratos respiraram livremente, mas todos os movimentos foram restringidos. Foi realizada uma sessão diária de contenção durante cinco dias entre 08:00 e 10:00 da manhã; fez-se um intervalo de dois dias, em que não houve qualquer manipulação dos animais. Posteriormente, nos dois dias subsequentes, eles foram submetidos novamente a uma sessão diária de contenção.

5.6 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

O exercício moderado foi realizado em esteira motorizada (Insight EP-131) durante três semanas, sendo 5 sessões semanais (uma sessão por dia), com duração de 30 minutos entre 08:00 e 10:00 da manhã. A velocidade da corrida na esteira aumentou gradualmente de acordo com a semana de treino. Ela foi de 5 m/min na primeira semana e depois, aumentou para 10 m/min e 15 m/min na segunda e terceira semanas, respectivamente (MONTEIRO *et al.*, 2011).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL

Entre o 99º e o 108º dia de vida de cada animal foi realizado o registro da atividade elétrica cerebral através da DAC. Para o registro, os animais foram submetidos à anestesia, por via intraperitoneal, com uma mistura de uretana a 10% e cloralose a 0,4%, na dose de 1000 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente. A temperatura retal do animal foi mantida em torno de 37 ± 1 °C durante todo o experimento. A cabeça do animal foi fixada em aparelho estereotáxico para permitir a incisão e remoção da pele e do periósteo e a exposição do crânio. Por meio de trepanação, foram feitos três orifícios (anterior, médio e posterior, de cerca de 3 mm de diâmetro cada), alinhados paralelamente à linha média, ao nível do hemisfério cerebral direito. Dois orifícios

foram trepanados no osso parietal para registro da DAC; e, o outro, no osso frontal para sua deflagração.

A DAC foi provocada aplicando-se o estímulo (solução de KCl a 2%), durante um minuto, através do orifício anterior. Os registros eletrofisiológicos foram realizados utilizando-se eletrodos impolarizáveis (tipo “Ag-AgCl”) confeccionados no próprio laboratório. Nos dois pontos corticais parietais (um em cada orifício) foi registrada e gravada a variação lenta de voltagem que acompanha a DAC utilizando um sistema digital (EMG systems). As variações corticais de voltagem foram registradas contra um eletrodo de referência comum, colocado sobre os ossos nasais, nos quais o potencial é invariável. O registro foi feito por um período de 4 horas. Ao término da sessão, foi procedida a eutanásia através de lesão bulbar, sob anestesia profunda. Todo esforço foi feito para minimizar o sofrimento dos animais. Na Figura 3 está apresentado o delineamento experimental do estudo.

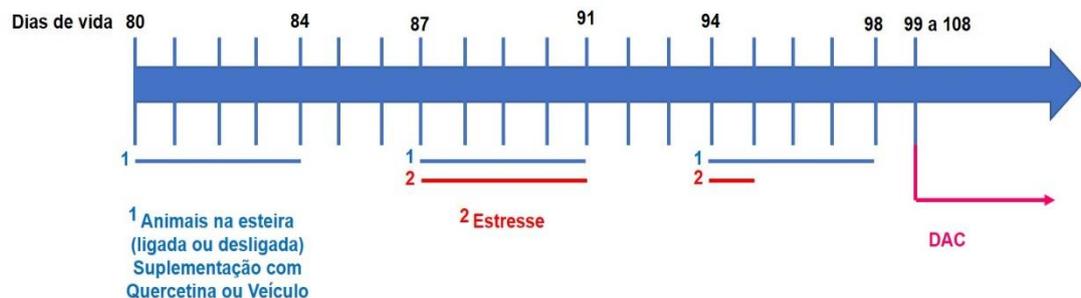


Figura 3. Linha do tempo do delineamento experimental

Foram calculados os parâmetros eletrofisiológicos da DAC: velocidade, amplitude e duração do fenômeno. A velocidade da DAC foi calculada a partir do tempo necessário para uma onda passar pela distância entre os dois pontos de registro inseridos no córtex. A amplitude é obtida pela altura entre a base e o pico de cada onda de DAC e a duração é medida pelo período decorrido entre o início e o final de cada onda.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (dp). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar parâmetros da atividade elétrica

cerebral e o peso entre os grupos. Nas comparações em que ANOVA indicou diferença significativa foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Foi considerado como nível de significância um valor de $p < 0,05$. Utilizou-se o programa SigmaStat v3.0 para as referidas análises.

6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL

ANOVA não indicou diferença intergrupo no peso corporal aos 80 dias de vida [F (4,55) = 2,583, $p = 0,047$], que foi a idade de início do treinamento físico ou da suplementação com quercetina. Nas demais comparações, dias 87, 94 e no dia do experimento, ANOVA mostrou diferenças intergrupos, respectivamente, [F (4,55) = 3,875, $p = 0,008$], [F (4,55) = 5,762, $p < 0,001$] e [F (4,55) = 3,346, $p = 0,016$]. As comparações *a posteriori* (teste de Holm-Sidak) indicaram que o grupo Contenção (C), apresentou peso corporal menor do que o Grupo Controle (GC) nos dias de vida 87 e 94, mas houve uma recuperação do peso no dia do experimento. Os pesos corporais no dia 87 foram de $314,27 \pm 24,93$ g C vs. $351,62 \pm 20,12$ g GC; no dia 94, de $305,10 \pm 30,74$ g C vs. $360,16 \pm 32,54$ g GC; e, no dia do experimento, de $341,21 \pm 32,91$ g C vs. $370,32 \pm 32,68$ g GC. Os animais que sofreram estresse por contenção, mas foram tratados com quercetina (C+Q8 e C+Q15) também apresentaram pesos corporais menores do que o do GC no dia de vida 94 ($328,07 \pm 26,09$ g, C+Q8 e $324,11 \pm 30,63$ g, C+Q15). Contudo, no dia do experimento, apenas o grupo C+Q15 apresentou peso corporal reduzido ($329,43 \pm 31,98$) em relação ao GC. Nas comparações entre o grupo que sofreu contenção, mas realizou treinamento moderado (C+TM), observou-se que ele manteve o peso corporal semelhante ao do GC durante todo o período. Todas as demais comparações intergrupos, nos diferentes dias de avaliação, não foram estatisticamente significantes (Figura 4).

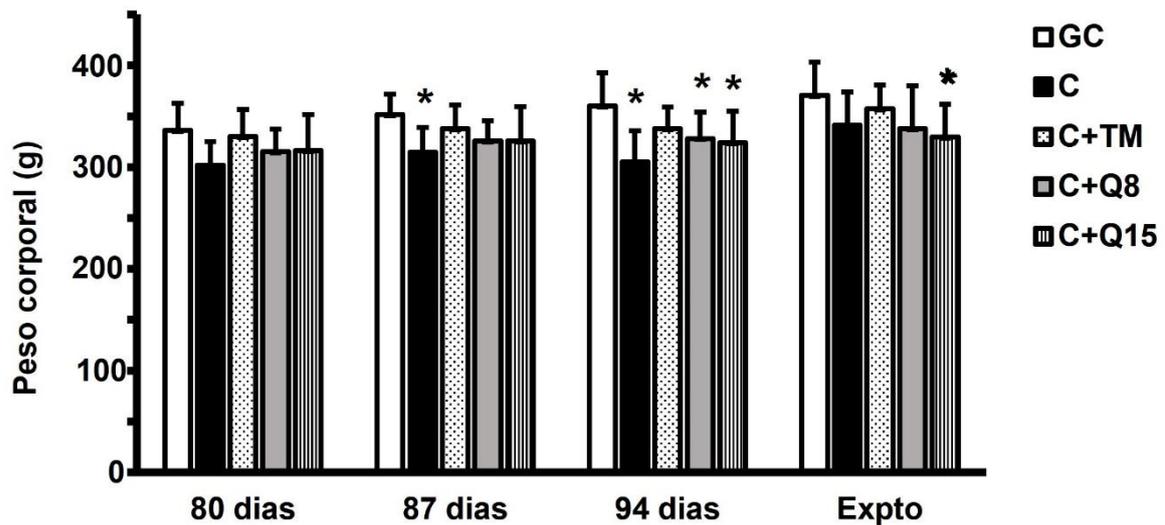


Figura 4. Peso corporal (g), de ratos machos com idades de 80, 87 e 94 dias, bem como no dia do experimento. GC (Grupo Controle), C (Contenção, grupo que sofreu estresse por contenção), C+TM (Contenção + Treinamento Moderado, grupo que sofreu estresse e treinamento físico moderado), C+8Q (Contenção + 8 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 8 dias de tratamento com quercetina), C+15Q (Contenção + 15 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 15 dias de tratamento com quercetina). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (GC).

6.2 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A Figura 5 apresenta registros eletrofisiológicos na superfície cortical de um rato Wistar de cada condição estudada (Grupo Controle – GC; Contenção – C; Contenção + Treinamento Físico Moderado – C+TM; Contenção + Quercetina por 8 dias – C+Q8; Contenção + Quercetina por 15 dias – C+Q15). A variação lenta de potencial nos registros denota a presença da DAC após estimulação com KCl. De maneira geral, a aplicação tópica de KCl a 2% (aproximadamente 270 mM de KCl), no córtex frontal do hemisfério direito, provocou uma única onda de DAC. Esta onda se propagou sem interrupção até o córtex parietal, onde foi registrada. A variação lenta de potencial foi recuperada gradualmente após a DAC.

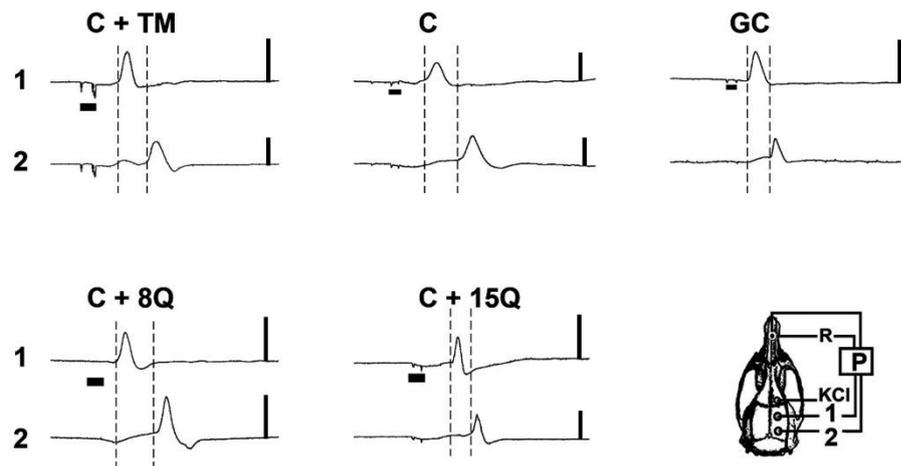


Figura 5. Registros da variação lenta de potencial em dois pontos da superfície do hemisfério direito, mostrando a passagem da DAC em ratos adultos. GC (animal do Grupo Controle), C (animal do grupo Contenção), C+TM (animal do grupo Contenção + Treinamento Moderado), C+8Q (animal do grupo Contenção + 8 dias de Quercetina), C+15Q (animal do grupo Contenção + 15 dias de Quercetina). O diagrama do crânio mostra as posições 1 e 2 do registro, a posição do eletrodo de referência comum (R), nos ossos nasais, e o ponto de aplicação do estímulo deflagrador da DAC (KCl). As barras verticais sólidas à direita indicam 10 mv (variação lenta negativa). As barras horizontais sob as linhas do registro P1 indicam o tempo (1 minuto) de estimulação com KCl. As linhas verticais tracejadas indicam a latência da DAC para cruzar a distância entre os eletrodos. Fonte: Autor.

Referente à velocidade de propagação da DAC (Figura 6), ANOVA indicou diferenças intergrupos [$F(4,573) = 136,199$, $p < 0,001$]. Inicialmente, foram comparados o grupo controle (GC) e o grupo contenção (C), que obtiveram os seguintes valores de velocidade da DAC (média \pm dp), respectivamente: $3,58 \pm 0,40$ mm/min e $2,44 \pm 0,30$ mm/min. As comparações do teste *post-hoc* (Holm-Sidak) mostraram que o estresse por contenção induziu a uma redução de $32 \pm 3\%$ na velocidade de propagação da DAC em comparação ao grupo controle.

Posteriormente, foram comparados o grupo que sofreu o estresse por contenção (C) com os demais grupos que, além da contenção, foram submetidos às demais intervenções (treinamento físico moderado (C+TM) ou suplementação com quercetina (C+Q8 e C+Q15)). Os valores de velocidade de propagação da DAC (média \pm dp) do grupo C+Q8 ($2,62 \pm 0,47$ mm/min) foram iguais ao do grupo contenção. Os animais dos grupos C+TM e C+Q15 apresentaram valores de velocidade de propagação da DAC (média \pm dp) de $2,95 \pm 0,29$ mm/min e de $3,13 \pm 0,56$ mm/min, respectivamente. Esses valores representam um aumento de $21 \pm 6\%$ e de $28 \pm 19\%$,

respectivamente, em relação ao grupo contenção (C).

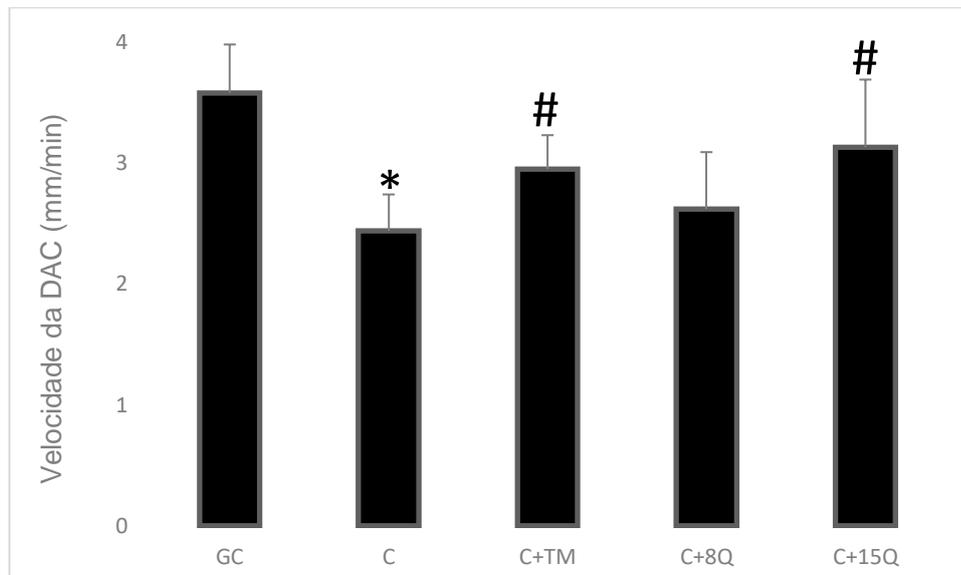


Figura 6. Velocidade da DAC (em mm/min), em ratos machos, com 99-108 dias de idade. GC (Grupo Controle), C (Contenção, grupo que sofreu estresse por contenção), C+TM (Contenção + Treinamento Moderado, grupo que sofreu estresse e treinamento físico moderado), C+8Q (Contenção + 8 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 8 dias de tratamento com quercetina), C+15Q (Contenção + 15 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 15 dias de tratamento com quercetina). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de 12 episódios da DAC por rato, que foram registrados a intervalos de 20 minutos em uma sessão de 4 horas. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Controle (GC), # $p < 0,05$ em relação ao Contenção (C).

Em relação a amplitude da DAC, ANOVA também indicou diferenças intergrupos [$F(4,987) = 22,056$, $p < 0,001$]. Nas comparações *a posteriori*, observou-se que a amplitude da DAC do grupo Contenção (C; $13,58 \pm 7,42$ mV) foi similar à do grupo Contenção + Quercetina 8 dias (C+Q8; $12,24 \pm 6,32$ mV) e significativamente maior que a dos demais grupos. Não houve diferenças entre os grupos Controle (GC), Contenção + Treinamento Moderado (C+TM) e Contenção + Quercetina 15 dias (C+Q15). Os valores da amplitude (média \pm dp) foram, respectivamente: $9,98 \pm 6,8$ mV, $9,34 \pm 5,06$ mV e $8,94 \pm 5,68$ mV. (Figura 7).

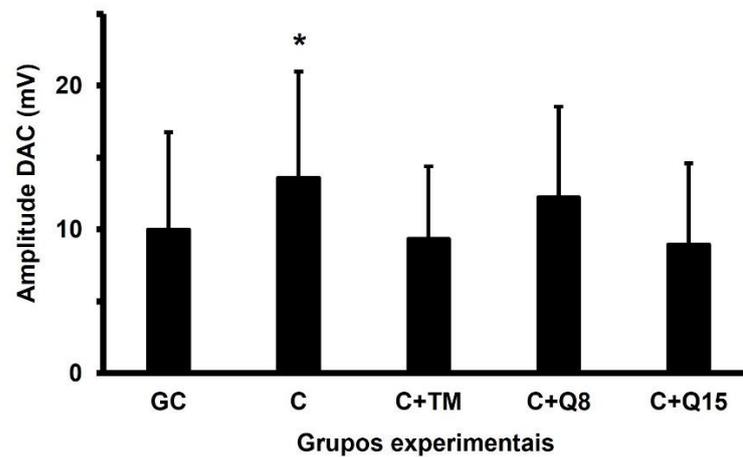


Figura 7. Amplitude da DAC (mV) em ratos machos, com 99-108 dias de idade. GC (Grupo Controle), C (Contenção, grupo que sofreu estresse por contenção), C+TM (Contenção + Treinamento Moderado, grupo que sofreu estresse e treinamento físico moderado), C+8Q (Contenção + 8 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 8 dias de tratamento com quercetina), C+15Q (Contenção + 15 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 15 dias de tratamento com quercetina). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão de 12 episódios da DAC por rato, que foram registrados a intervalos de 20 minutos em uma sessão de 4 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A duração da DAC foi outro parâmetro para o qual ANOVA indicou diferença intergrupo [F (4, 964) = 125,289, $p = 0,001$]. O teste Holm-Sidak mostrou que a duração da DAC no grupo Contenção (C) foi significativamente maior do que em todos os demais grupos ($157,65 \pm 86,72$ s). Não houve diferenças entre as demais comparações. A duração (média \pm dp) da DAC foi de $69,64 \pm 16,81$ s no GC; de $70,37 \pm 19,45$ s no C+TM; de $86,72 \pm 31,56$ s no C+Q8; e de $68,36 \pm 25,41$ s no C+Q15 (Figura 8).

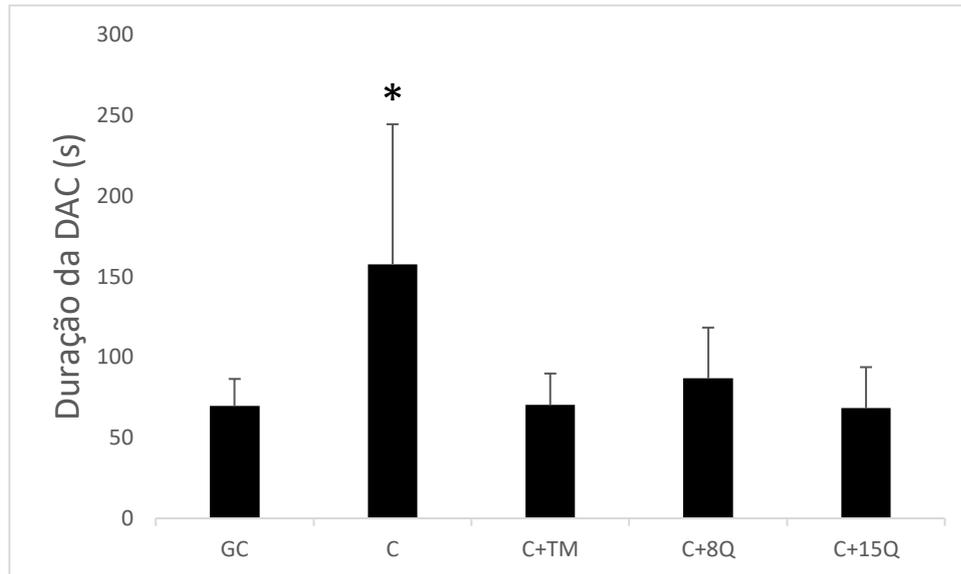


Figura 8. Duração da DAC (s) em ratos machos, com 99-108 dias de idade. GC (Grupo Controle), C (Contenção, grupo que sofreu estresse por contenção), C+TM (Contenção + Treinamento Moderado, grupo que sofreu estresse e treinamento físico moderado), C+8Q (Contenção + 8 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 8 dias de tratamento com quercetina), C+15Q (Contenção + 15 dias de Quercetina, grupo que sofreu estresse, mas recebeu 15 dias de tratamento com quercetina). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de 12 episódios da DAC por rato, que foram registrados a intervalos de 20 minutos em uma sessão de 4 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado pela primeira vez que o estresse por contenção, um tipo de estresse físico, reduziu a velocidade de propagação da DAC. Adicionalmente, foi verificado que a velocidade de propagação daquele fenômeno aumentava quando os animais estressados realizavam treinamento físico moderado, ou recebiam suplementação com quercetina (150 mg/kg). Observou-se também que o uso da quercetina reduziu o peso corporal dos ratos.

Um dos pontos importantes deste trabalho é que o estresse por contenção dificultou a propagação da DAC no cérebro. Como principal mecanismo responsável por este efeito, sugere-se que a contenção provoca estresse oxidativo, acúmulo de radicais livres. Embora não tenha sido determinado aqui o efeito da contenção em acentuar a produção de radicais livres, isto tem sido descrito na literatura (ASARI *et al.*, 2021; AKINLUYI *et al.*, 2022; CHAOUI *et al.*, 2022). Adicionalmente, há evidências de que o estresse oxidativo pode alterar a deflagração e a disseminação da DAC no sistema nervoso (MALKOV *et al.*, 2014).

Sousa e colaboradores (2018) demonstraram que o envelhecimento provoca

distúrbios metabólicos condizentes com o estresse oxidativo e induz diminuição da velocidade de propagação da DAC. Outro estudo também desenvolvido por Sousa e colaboradores (2019), mostra que a sepse desacelera a velocidade de propagação da DAC. A sepse é uma síndrome clínica que se caracteriza pela produção excessiva de radicais livres (CATALÃO *et al.*, 2016). Todos esses achados corroboram com a possibilidade de que o estresse oxidativo decorrente do estresse por contenção esteja na base dos efeitos eletrofisiológicos observados no presente trabalho.

O cérebro é um órgão abundante em lipídios, mas possui baixa capacidade antioxidante intrínseca. Dessa forma, o estresse oxidativo pode acarretar à região encefálica um colapso metabólico que acontece devido a alterações na transmissão sináptica; a oxidação anormal de NAD(P)H e FADH₂, associada a intenso consumo de oxigênio; e, a despolarização neuronal maciça (HULBERT *et al.*, 2007; MALKOV *et al.*, 2014; SALIM, 2017). Tem sido visto que em processos fisiológicos que promovem estresse oxidativo, como o envelhecimento, as espécies reativas de oxigênio podem oxidar canais iônicos de potássio e cálcio e modificar a funcionalidade de receptores de membrana, como o receptor NMDA (N-metil-D-aspartato). O receptor NMDA é indispensável para deflagrar e propagar a DAC e, dessa forma, comprometer a velocidade de disseminação do fenômeno (PATEL & SESTI, 2016).

Outro ponto que reforça a ideia do estresse oxidativo é que a suplementação com o antioxidante quercetina (150 mg/kg) promoveu um efeito de normalização da velocidade da DAC nos animais estressados. Resposta semelhante foi observada nos animais que realizaram treinamento moderado, o qual tem sido associado capaz de exercer uma ação antioxidante (DE SOUSA FERNANDES *et al.*, 2022). O efeito protetor do treinamento físico para o sistema nervoso, identificado através da atividade elétrica cerebral tem sido mostrado em vários trabalhos (MONTEIRO *et al.*, 2011; VITOR-DE-LIMA *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2020; VITOR-DE-LIMA *et al.*, 2023) Contudo, esta é a primeira vez em que o treinamento foi realizado durante um período de estresse físico.

De maneira geral, os ratos que realizam treinamento físico com intensidade moderada apresentam diminuição da velocidade de propagação da DAC. Assim, tem sido considerado que o treinamento diminui a excitabilidade cerebral. Uma das explicações é de que ele aumenta a liberação de alguns neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina. O papel do sistema serotoninérgico em reduzir a

excitabilidade cerebral e a velocidade de propagação da DAC tem sido bem documentado (MONTEIRO *et al.*, 2015). No presente trabalho, o treinamento aumentou a velocidade nos animais estressados, mas tornou essa velocidade similar à dos animais controles.

É importante destacar que não é apenas aumento ou redução da velocidade DAC *per se* que definem uma resposta boa ou ruim para o cérebro. Se o sistema nervoso está em uma condição de hiperexcitabilidade, o ideal é uso de estratégias que reduzam esse efeito. Contudo, se a excitabilidade cerebral estiver normal, a sua redução poderá ser indesejável. Por exemplo, é essencial a existência de algum grau de excitabilidade cerebral para funções encefálicas tais como memória, aprendizagem (DUNN & KACZOROWSKI, 2019). Considera-se essa normalização da velocidade da DAC nos animais treinados, mas que passaram por uma condição de estresse, uma resposta que advoga favoravelmente quanto ao papel benéfico do exercício sobre o cérebro.

O treinamento físico pode beneficiar o cérebro por meio do aumento da expressão de BDNF. Este fator neurotrófico promove a plasticidade cerebral e sinalização sináptica, a formação de novos neurônios e vasos sanguíneos, o aumento da liberação de neurotransmissores como a serotonina, maior aporte de oxigênio na região cerebral. Todas essas ações podem modular a comunicação entre as células no sistema nervoso e influenciar a excitabilidade neural (ADLARD & COTMAN, 2004; MATTSON, 2004; MELLO, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2011; MEREGE FILHO *et al.*, 2014).

Concernente aos antioxidantes, estudos têm mostrado que essas substâncias beneficiam a resposta eletrofisiológica cerebral (LOPES-DE-MORAIS *et al.*, 2014; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2018; DANTAS *et al.*, 2021). No presente trabalho, atribuiu-se à quercetina uma ação restauradora da atividade elétrica do cérebro; pois, assim como o treinamento físico, ela foi capaz de normalizar a eletrofisiologia cortical nos animais estressados. Este efeito foi dependente diretamente da duração do tratamento. Há evidências de que a quercetina pode promover a modulação de vias antioxidantes importantes, como a via do Nrf2-ARE, essencial à defesa celular (SAW *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016). Além disso, ela pode aumentar a expressão da Paraoxonase 2 (PON2), enzima encontrada nas mitocôndrias de células do cérebro, que contribui para a neuroproteção (COSTA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016).

É importante mencionar que há relatos na literatura de normalização da velocidade

de propagação da DAC, mediante o uso de substâncias antioxidantes, semelhante ao que foi encontrado no presente trabalho. Sousa e colaboradores (2018; 2019) mostraram uma aceleração na velocidade de propagação da DAC em ratos idosos e sépticos, respectivamente, que eram suplementados com o extrato de murici, em comparação com ratos nas mesmas condições, porém sem o tratamento. O murici é rico em polifenóis, dentre eles, a quercetina. Dada a relação da DAC com patologias como a epilepsia, a suplementação com quercetina poderia atenuar os danos neurais, devido às suas propriedades antioxidantes (DAVIS *et al.*, 2009), e aprimorar a atividade elétrica cortical de pacientes epiléticos. Em especial porque a epilepsia está associada com uma diminuição da velocidade de propagação da DAC (FRANCISCO *et al.*, 2018; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2018)

Outros parâmetros eletrofisiológicos foram avaliados no presente trabalho, a saber, a amplitude e a duração da DAC. Observou-se aumento da amplitude da DAC nos animais que sofreram estresse por contenção sem tratamento, esses mesmos animais apresentaram também maior duração do fenômeno, o que indica aumento da dificuldade de recuperação do tecido cortical. Sabe-se que no tecido cortical em boas condições, a propagação da DAC é seguida pela interrupção da atividade sináptica espontânea e evocada, que se recupera *a posteriori* (GERASIMOVA *et al.*, 2021).

Em condições adversas, como o estresse, a recuperação do tecido cortical pode ser lenta, devido ao retardo na restauração dos gradientes iônicos, proveniente da diminuição da atividade da Na⁺/K⁺ ATPase. Essa redução na restauração dos gradientes iônicos, promove alterações na liberação de neurotransmissores como o glutamato e aspartato. O glutamato por sua vez, pode permanecer mais tempo na fenda sináptica, e conseqüentemente, influenciar a excitabilidade celular (RASIĆ-MARKOVIĆ *et al.*, 2009; GERASIMOVA *et al.*, 2021).

No que diz respeito ao peso corporal, as alterações observadas não parecem refletir efeito do estresse por contenção. Os animais do grupo contenção apresentaram aleatoriamente um peso corporal reduzido aos 87 dias de vida, que foi o primeiro dia do estresse. Dados mostram que o estresse físico pode afetar o peso corporal tanto no sentido da redução, quanto do aumento (LENGLOS *et al.*, 2013; NAIR *et al.*, 2021; KUTI *et al.*, 2022). No presente estudo, a intensidade/duração do estresse não parece ter sido suficiente para alterar o peso do corpo.

Por outro lado, a quercetina aparentemente reduziu o peso corporal. Pois, a alteração no peso ocorreu enquanto o animal estava sendo suplementado com o

antioxidante. O grupo estressado que recebeu quercetina durante 8 dias apresentou redução do peso apenas aos 94 dias de vida. O grupo que recebeu a quercetina por 15 dias, teve peso corporal menor aos 94 dias de vida, bem como no dia do experimento. Há evidências de que os flavonoides podem modular o metabolismo lipídico (MBIKAY *et al.*, 2018; DERAKHSHANIAN *et al.*, 2020). Dessa forma, a suplementação com quercetina pode aumentar a oxidação, ou diminuir a síntese de ácidos graxos, contribuindo para a redução do peso corporal (SANGEETHA *et al.*, 2016; DERAKHSHANIAN *et al.*, 2020).

Diante de todo exposto, é possível inferir que o estresse prejudica o funcionamento do sistema nervoso, afetando, inclusive, a eletrofisiologia cerebral. Todavia, o uso de antioxidantes, como a quercetina, e a prática de treinamento físico moderado protegem o cérebro contra o efeito danoso do estresse. Assim, essas duas estratégias representam propostas adjuvantes, de baixo custo e de benefícios significativos na terapia de doenças neurológicas e de insultos ambientais que possam afetar as funções neurais, como o estresse.

8 CONCLUSÃO

Os achados revelam que o estresse por contenção promove redução da velocidade de propagação da DAC, em relação aos animais controles. Todavia, a suplementação com quercetina ou o treinamento físico moderado promove aumento da velocidade de propagação daquele fenômeno nos animais estressados. Além disso, o estresse promove aumento da duração e da amplitude da DAC.

Os tratamentos apresentados no presente trabalho demonstram efeito protetor da atividade elétrica cerebral de ratos que sofreram estresse por contenção. O trabalho apresenta algumas limitações, tais como a ausência de dosagem de enzimas oxidativas e se o efeito da suplementação seria persistente. Experimentos adicionais poderão esclarecer essas questões.

REFERÊNCIAS

- ADLARD, P.A; COTMAN, C.W. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. **Neuroscience**, v. 124, n. 4, 985–992, 2004.
- AGUIAR, J.R; ADERBAL, S; PINHO, A.P. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte [online]**, v. 13, n. 5, 355-360, 2007.
- AKINLUYI, E; ADERIBIGBE, A; ADEOLUWA, O; ADEBESIN, A; ADEOLUWA, G. Ameliorating Effect of Morin Hydrate on Chronic Restraint Stress-induced Biochemical Disruption, Neuronal, and Behavioral Dysfunctions in BALB/c Mice. **Basic and clinical neuroscience**, v.13, n.3, 393–406, 2022.
- ALEXANDER, S.P. Flavonoids as antagonists at A1 adenosine receptors. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 11, 1009-12, 2006.
- ANDERSON, G. S; DI NOTA, P. M; METZ, G. A. S; ANDERSEN, J. P. The Impact of Acute Stress Physiology on Skilled Motor Performance: Implications for Policing. **Frontiers in psychology**, v.10, n.2501, 2019.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, P.C.F; LIMA, D.S.C; OZIAS, M.G; OLIVEIRA, M.B; GUIMARÃES, N.X, *et al.* Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaning and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v.200, n.2, 275–82,2006.
- ASARI, M. A; SIRAJUDEEN, K. N. S; MOHD YUSOF, N. A; MOHD AMIN, M. S. I. DHA-rich fish oil and Tualang honey reduce chronic stress-induced oxidative damage in the brain of rat model. **Journal of traditional and complementary medicine**, v.12, n.4, 361–366, 2021.
- BALI, A; GUPTA, S; SINGH, N; JAGGI, A. S. Implicating the role of plasma membrane localized calcium channels and exchangers in stress-induced deleterious effects. **European journal of pharmacology**, v.714, 229–238, 2013.
- BLOMSTRAND E. Amino acids and central fatigue. **Amino Acids**, v.20, n.1, 25–34,2001.

CATALÃO CH, SANTOS-JÚNIOR NN, DA COSTA LH, SOUZA AO, ALBERICI LC, ROCHA MJ. Brain oxidative stress during experimental sepsis is attenuated by simvastatin administration. **Molecular Neurobiology**, v.54, n.9, 7008–18, 2016.

CATANHO, F. O papel da intensidade e do volume na prescrição do exercício e os impactos na prescrição nutricional. **Revista Brasileira De Nutrição Funcional**, v. 44, n. 79, 2019.

CHAOUI, N; ANARGHOU, H; LAAROUSSI, M; ESSAIDI, O; NAJIMI, M; CHIGR, F. Long lasting effect of acute restraint stress on behavior and brain anti-oxidative status. **AIMS neuroscience**, v.9, n.1, 57–75,2022.

COSTA, L. G; TAIT, L; DE LAAT R., et al. Modulation of paraoxonase 2 (PON2) in mouse brain by the polyphenol quercetin: a mechanism of neuroprotection?. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 9, 1809–1818,2013.

COSTA, L.G; GARRICK, J.M; ROQUÈ, P.J; PELLACANI, C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016:2986796, 2016.

COTMAN, C.W; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, 295-301, 2002.

DANTAS, D. M. M; CAHÚ, T. B; OLIVEIRA, C. Y. B; ABADIE-GUEDES, R; ROBERTO, N. A; SANTANA, W. M; GÁLVEZ, A. O; GUEDES, R. C. A; BEZERRA, R. S. Chlorella vulgaris functional alcoholic beverage: Effect on propagation of cortical spreading depression and functional properties. **PloS one**, v.16, n.8, 2021.

DAVIS, J.M; ZHAO Z; STOCK, H.S, et al. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **American Journal of physiology**, v. 284, n. 2, 399-404, Fev.2003.

DAVIS, J. MARK; MURPHY, E.A; CARMICHAEL, M.D. Effects of the Dietary Flavonoid Quercetin Upon Performance and Health. **Current Sports Medicine Reports**, v. 8, n. 4, 206-213, 2009.

DE KLOET, E.R; OITZL, M.S; JOËLS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?. **Trends in Neurosciences**. v. 22, 422–426, 1999.

DERAKHSHANIAN, H; DJALALI, M; DJAZAYERY, A; JAVANBAKHT, M. H; ZAREI, M; HEKMATDOOST, A; ESLAMIAN, G; MIRHASHEMI, S. S; DEHPOUR, A. R Quercetin Ameliorates Lipid and Apolipoprotein Profile in High-Dose Glucocorticoid Treated Rats. Quercetina Melhora o Perfil Lipídico e Apolipoproteico em Ratos Tratados com Glicocorticoides em Altas Doses. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.115, n.1, 102–108, 2020.

DE SOUSA FERNANDES, M. S; AIDAR, F. J; DA SILVA PEDROZA, A. A; DE ANDRADE SILVA, S. C; SANTOS, G. C. J; DOS SANTOS HENRIQUE, R; CLEMENTE, F. M; SILVA, A. F; *et al.* Effects of aerobic exercise training in oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis markers on prefrontal cortex in obese mice. **BMC sports science, medicine & rehabilitation**, v.14, n.1, 213,2022.

DING, J. X; RUDAK, P. T; INOUE, W; HAERYFAR, S. M. M. Physical restraint mouse models to assess immune responses under stress with or without habituation. **STAR protocols**, v.2, n.4, 2021.

DRAGOȘ, D; TĂNĂSESCU, M.D. The effect of stress on the defense systems. **Journal of Medicine and Life**, v. 3, n. 1, 10-8, 2010.

DUNN, A. R; KACZOROWSKI, C. C. Regulation of intrinsic excitability: Roles for learning and memory, aging and Alzheimer's disease, and genetic diversity. **Neurobiology of learning and memory**, v.164, 2019.

EGAN, B.; ZIERATH, J.R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**; v. 17, 162-184, 2013.

FERRO, I.S; ARAÚJO, M.Y.C; ROCHA, A.P.R; QUEIROZ, D.C; JUDAY, V; CODOGNO, J.S. Physical exercise program for hypertensive patients attended by primary health care: anthropometric variables and healthcare expenditure. **Journal of Physical Education**, v. 30: e3058, 2019.

FRANCISCO, E. D. S; GUEDES, R. C. A. Sub-Convulsing Dose Administration of Pilocarpine Reduces Glycemia, Increases Anxiety-Like Behavior and Decelerates Cortical Spreading Depression in Rats Suckled on Various Litter Sizes. **Frontiers in neuroscience**, v.12, n.897, 2018.

GERASIMOVA, E; BURKHANOVA, G; CHERNOVA, K; ZAKHAROV, A; ENIKEEV, D; KHAERTDINOV, N; GINIATULLIN, R; SITDIKOVA, G. Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats. **Behavioural brain research**, v.409, 113324, 2021.

GUEDES, R.C.A; AMÂNCIO-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** 2002;5(2):115–23.

GUEDES, R.C.A, ROCHA-DE-MELO, A.P, TEODÓSIO, N.R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, v.56, n.1, 32 – 35,2004.

GUO, S; HUANG, Y; ZHANG, Y; HUANG, H; HONG, S; LIU, T. Impacts of exercise interventions on different diseases and organ functions in mice. *Journal of sport and health science*, v.9, n.1, 53–73, 2020.

HANSSSEN, H; MINGHETTI, A; MAGON, S; ROSSMEISSL, A; RASENACK, M; PAPADOPOULOU, A., KLENK, C; FAUDE, O; ZAHNER, L; SPRENGER, T; DONATH, L. Effects of different endurance exercise modalities on migraine days and cerebrovascular health in episodic migraineurs: A randomized controlled trial. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v.28, n.3, 1103–1112,2018.

HARWOOD, M; DANIELEWSKA-NIKIEL, B; BORZELLECA, J.F; FLAMM, G. W; WILLIAMS, G. M; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, 2179-205, 2007.

HUGHES, D. C; ELLEFSEN, S; BAAR, K. Adaptations to Endurance and Strength Training. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v.8, n.6, 2018.

HULBERT, A.J; PAMPLONA, R; BUFFENSTEIN, R; BUTTEMER, W.A. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, 1175-213, 2007.

JOYNER M.J; DEMPSEY, J.A. Physiological Redundancy and the Integrative Responses to Exercise. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n.5, a029660, 2018.

KURA, G.G; FILHO, H.T. Adaptaciones agudas y crónicas de los ejercicios de resistencia en el sistema cardiovascular. **EFDeportes.com, Revista Digital**, v. 15, n. 153, 2011.

KUTI, D; WINKLER, Z; HORVÁTH, K; JUHÁSZ, B; SZILVÁSY-SZABÓ, A; FEKETE, C; FERENCZI, S; KOVÁCS, K. J. The metabolic stress response: Adaptation to acute-, repeated- and chronic challenges in mice. **iScience**, v. 25, n.8, 104693, 2022.

KOE, AS; JONES NC; SALZBERG MR. Early life stress as an influence on limbic epilepsy: an hypothesis whose time has come?. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.3, n.16,2009

LEÃO, AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, 7: 359–390,1944.

LEÃO, A.A.P. Further observations on the spreading depression of activity in cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**,10: 409–414,1947.

LENGLOS, C; MITRA, A; GUÈVREMONT, G; TIMOFEEVA, E. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. **Genes, brain, and behavior**, v.12, n.4, 370–387,2013.

LEYTON, L; HOTT, M; ACUÑA, F; CAROCA, J; NUÑEZ, M; MARTIN, C; ZAMBRANO, A; CONCHA, M. I; OTTH, C. Nutraceutical activators of AMPK/Sirt1 axis inhibit viral production and protect neurons from neurodegenerative events triggered during HSV-1 infection. **Virus Research**, v. 205, 63–72,2015.

Li, Y; Yao, J; Han, C; Yang, J; Chaudhry, M.T; Wang, S; Liu, H; Yin, Y. “Quercetin, Inflammation and Immunity.” **Nutrients**, v.8, n. 3, 167, 2016.

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

LUO, L; LIU, M; XIE, H; FAN, Y; ZHANG, J; LIU, L; LI, Y; ZHANG, Q; WU, J; JIANG, C; WU, Y. High-Intensity Interval Training Improves Physical Function, Prevents

Muscle Loss, and Modulates Macrophage-Mediated Inflammation in Skeletal Muscle of Cerebral Ischemic Mice. **Mediators of inflammation**,1849428, 2021.

MACINNIS, M.J.; GIBALA, M.J. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 9, 2915-2930, 2017.

MALKOV, A.; IVONOV, A. I.; POPOVA, I.; MUKHTAROV, M.; GUBKINA, O.; WASEEM, T. *et al.* Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 34, n. 9, 1540-1549, 2014.

MARANHÃO-FILHO, PA.- Depressão Alastrante: Importância para a Fisiopatologia da Enxaqueca. **Revista Neurociências**, v. 4, n.3, 99-104, 1996.

MATTSON, M.P; MAUDSLEY, S; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 10, 589-94, 2004.

MBIKAY M; MAYNE J; SIROIS F; FEDORYAK O; RAYMOND A; NOAD J, *et al.* Mice fed a high-cholesterol diet supplemented with quercetin-3-glucoside show attenuated hyperlipidemia and hyperinsulinemia associated with differential regulation of PCSK9 and LDLR in their liver and pancreas. **Molecular Nutrition & Food Research**, 62(9):1700729,2018.

MCEWEN, B.S; WEISS, J.M; SCHWARTZ, L.S. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. **Nature**, v. 220(5170), 911–912,1968.

MELLO, M. T. DE; BOSCOLO, R. A; ESTEVES, A. M; TUFIK, S.O exercício físico e os aspectos psicobiológicos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 3, 2005.

MENDES-DA-SILVA, R. F; FRANCISCO, E. D. S; ARAÚJO GUEDES, R. C. Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: Electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. **Brain research bulletin**, 142, 414–421, 2018.

MEREGE FILHO, C.A.A; ALVES, C.R.R; SEPÚLVEDA, C.A; COSTA, A.S; JUNIOR, A.H.L; GUALANO, B. Influence of physical exercise on cognition: an update on

physiological mechanisms. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 20, n. 3, 237-241, 2014.

MONTEIRO, H.M.C; SILVA, D.L; FRANÇA, J.P.B.D; MAIA, L.M.S; ANGELIM, M.K.C; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; GUEDES, R.C.A. Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 14, 112–118, 2011.

MONTEIRO, H.M.C; BARRETO-SILVA, N.L; DOS SANTOS, E.G; SANTOS, A.S; SOUSA, M.S.B; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A. Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v.762, 49–54, 2015.

MONTEIRO, H. M. C; DE MENDONÇA, D. C; SOUSA, M. S. B; AMANCIO-DOS-SANTOS, A. Physical exercise counteracts the increase in velocity of propagation of cortical spreading depression imposed by early over-nutrition in rats. **Nutritional neuroscience**, v.23, n.2, 161–169, 2020.

NAIR, B. B; KHANT AUNG, Z; PORTEOUS, R; PRESCOTT, M., GLENDINING, K. A; JENKINS, D. E., AUGUSTINE, R. A; SILVA, M. S. B; YIP, S. H *et al.* Impact of chronic variable stress on neuroendocrine hypothalamus and pituitary in male and female C57BL/6J mice. **Journal of neuroendocrinology**, v.33, n.5, e12972, 2021.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem database. Quercetin, CID=5280343 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin> (Accessed June 16, 2021).

NOVAKOVA, B., HARRIS; P. R., PONNUSAMY, A; REUBER, M. The role of stress as a trigger for epileptic seizures: a narrative review of evidence from human and animal studies. **Epilepsia**, v.54, n.11, 1866–1876, 2013.

PONNUSAMY, A; MARQUES, J.L.B; REUBER M. Heart rate variability measures as biomarkers in patients with psychogenic nonepileptic seizures: potential and limitations. **Epilepsy & Behavior**, v.22, n.4, 685– 691, 2011.

PATEL, R; SESTI, F. Oxidation of ion channels in the aging nervous system. **Brain Research**, 1639:174-85, 2016.

PEDERSEN, B.K; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, 1055-81, 2000.

QU, L; LIANG, X.C; GU, B; LIU, W. Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy. **Neural Regeneration Research**. v.9, n. 12, 1195–1203, 2014.

RASIĆ-MARKOVIĆ, A; STANOJLOVIĆ, O; HRNCIĆ, D; KRSTIĆ, D; COLOVIĆ, M; SUSIĆ, V; RADOSAVLJEVIĆ, T; DJURIC, D. The activity of erythrocyte and brain Na⁺/K⁺ and Mg²⁺-ATPases in rats subjected to acute homocysteine and homocysteine thiolactone administration. **Molecular and cellular biochemistry**, v.327, n.1-2, 39–45, 2009.

SADIR, M. A; BIGNOTTO, M. M; LIPP, M. E. N. Stress e qualidade de vida. **Paideia**, v. 20, n. 45, 73-81, 2010.

SANGEETHA, K.S.S; REDDY, C.U.M; KALKURA SN. Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.7, n.10, 3924-30,2016.

SANTA-CLARA, H *et al.* Atividade física e exercício físico: especificidades no doente cardíaco. **Revista Factores de risco**, v. 35, 28-35,2015.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n.1, 201-205, 2017.

SAW, C. L; GUO, Y; YANG, A. Y., *et al.* The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, 303–311, 2014.

SOUSA, M. S. B; HOLANDA, I. M. S; MONTEIRO, H. M. C; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â. Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex. **Acta cirurgica brasileira**, v. 33, n.6, 472–482, 2018.

SOUSA, M. S. B; ALVES, D. V. S; MONTEIRO, H. M. C; GOMES, D. A; LIRA, E. C; AMANCIO-DOS-SANTOS, A. Sepsis impairs the propagation of cortical spreading

depression in rats and this effect is prevented by antioxidant extract. **Nutritional neuroscience**, v.24, n.2, 130–139, 2019.

TIDBALL, J.G. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, 1900-1908, 2005.

TSAO, J. P; BERNARD, J. R; HSU, H. C; HSU, C. L; LIAO, S. F; CHENG, I. S. Short-Term Oral Quercetin Supplementation Improves Post-exercise Insulin Sensitivity, Antioxidant Capacity and Enhances Subsequent Cycling Time to Exhaustion in Healthy Adults: A Pilot Study. **Frontiers in nutrition**, 9, 875319, 2022.

ULLAH, A; MUNIR, S; BADSHAH, S. L; KHAN, N; GHANI, L; POULSON, B. G; EMWAS, A. H; JAREMKO, M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n.22, 5243, 2020.

VITOR-DE-LIMA, S. M; MEDEIROS, L. B; BENEVIDES, R. D. L; DOS SANTOS, C. N; LIMA DA SILVA, N. O; GUEDES, R. C. A. Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. **Nutritional neuroscience**, v.22, n.6, 435–443, 2019.

VITOR-DE-LIMA, S. M; FIGUEIRA DE OLIVEIRA, M. L; TAVARES, I. S; LEANDRO, C. V. G; GUEDES, R. C. A. Maternal voluntary physical exercise in the adult rat: evidence of exercise-associated differences in maternal food intake, and in brain effects on the progeny. **Nutritional neuroscience**, 1–12, 2023.

WU, S; FENG, X; SUN X. Development and evaluation of the health belief model scale for exercise. **International Journal of Nursing Sciences**, v. 14, n. 7(Suppl 1), 23-30, 2020.

XIE, R; ZHAO, W; LOWE, S; BENTLEY, R; HU, G; MEI, H; JIANG, X; SUN, C; WU, Y; YUEYING, LIU. Quercetin alleviates kainic acid-induced seizure by inhibiting the Nrf2-mediated ferroptosis pathway. **Free radical biology & medicine**, v.191, 212–226,2022.

XU, D; HU, M.J; WANG, Y.Q; CUI, Y.L. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. **Molecules**, v. 24, n. 6: 1123, 2019.

YAMAUCHI, T; YOSHIOKA, T; YAMADA, D; HAMANO, T; OHASHI, M; MATSUMOTO, M; IIO, K., IKEDA, M *et al.* Cold-Restraint Stress-Induced Ultrasonic

Vocalization as a Novel Tool to Measure Anxiety in Mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.45, n.3, 268–275, 2022.

YARIBEYGI, H; PANAHI, Y; SAHRAEI, H; JOHNSTON, T.P; SAHEBKAR, A. The impact of stress on body function: A review. **EXCLI Journal**, v. 21, n. 16, 1057-1072, 2017.

ZHANG, W.; ROSENKRANZ, J. A. Repeated restraint stress enhances cue-elicited conditioned freezing and impairs acquisition of extinction in an age-dependent manner. **Behavioural Brain Research**, v. 248, 12-24, 2013.

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, 123
50709-100 / Recife - PE - Brasil
Fones: 3241-8042
www.ufpe.br

Recife, 26 de outubro de 2021

Ofício nº75/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Prof. Angela Amancio dos Santos
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
processo nº0093/2021

Certificamos que a proposta intitulada "Treinamento físico e quercetina: efeitos sobre excitabilidade cerebral em ratos submetidos a estresse por contenção.", registrado com o nº0093/2021 sob a responsabilidade da Prof. **Angela Amancio dos Santos** envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/10/2021.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/01/2022 a 20/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	50
Peso/idade	250g/ 80 dias
Sexo	Macho (50)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.