



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INTERAÇÃO EXERCÍCIO FÍSICO/SISTEMA COLINÉRGICO: ANÁLISE
ELETROFISIOLÓGICA EM RATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES
NUTRICIONAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÓPICO CORTICAL COM
AGONISTA E ANTAGONISTA COLINÉRGICO.**

CATARINA NICÁCIO DOS SANTOS

Orientador: PROF. DR. RUBEM CARLOS ARAÚJO GUEDES

**RECIFE
29/03/2024**

CATARINA NICÁCIO DOS SANTOS

**INTERAÇÃO EXERCÍCIO FÍSICO/SISTEMA COLINÉRGICO: ANÁLISE
ELETROFISIOLÓGICA EM RATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES
NUTRICIONAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÓPICO CORTICAL COM
AGONISTA E ANTAGONISTA COLINÉRGICO.**

Dissertação do Mestrado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes.

**RECIFE
2024**

CATARINA NICÁCIO DOS SANTOS

**INTERAÇÃO EXERCÍCIO FÍSICO/SISTEMA COLINÉRGICO: ANÁLISE
ELETROFISIOLÓGICA EM RATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES
NUTRICIONAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÓPICO CORTICAL COM
AGONISTA E ANTAGONISTA COLINÉRGICO.**

Dissertação apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Membro Interno)
UFPE

Prof.Dr Leucio Duarte Vieira Filho (Membro Interno)
UFPE

Prof. (a) Dr. (a) Tassia karin ferreira Borba

Dra. Elian da Silva Francisco (Membro Externo)
Egressa UFPE- dep. Nutrição

Data: _29_/_03_/_2024_

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, em segundo lugar à minha família que é minha base, e a todos que me apoiaram e acreditaram em mim, mesmo eu não acreditando no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao Rei, Eterno e Imortal, Invisível, o Único Deus, sejam honra e glória pelos séculos dos séculos; pelo Dom da vida, seu amor, zelo e cuidado comigo....

Aos meus pais (*Sr. Mario e Dona Graça*), que são exemplos de superação em meio a falta de recursos, que me suportaram nos meus momentos de crises existenciais e mesmo quando eu pensava que não ia conseguir chegar até onde cheguei, eles acreditaram em mim.

GRATIDÃO pro resto da minha vida à ELES; aos meus irmãos (*Elton e Ricardo*) por tudo que representam na minha caminhada.

Ao meu Orientador *Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes* que me mostrou o caminho das pedras, por qual tenho grande admiração e gratidão por sua inteira dedicação à Pesquisa e ao Ensino. Agradeço pela sua orientação durante o desenvolvimento desta tese. Obrigada por me receber no LAFINNT em 2014, desde lá, sempre com muita atenção, participando pontualmente na construção do meu pensamento científico que agora começa a dar seus primeiros passos. Muito obrigada!

A todos da Família LAFINNT, que me acolheram sem restrições e com muito carinho; e aos que passaram pelo laboratório durante esse período, grata, pelo apoio tecnológico e intelectual.

Aos queridos estagiários: *Maiara Pereira, Yasmim Duarte, Emilly Albuquerque e Rian Silva*, que com muita dedicação e garra, colaboraram para que esse projeto fosse executado; Parabéns pela iniciativa em crescer no campo da pesquisa e obrigada por me permitir compartilhar um pouco dos meus conhecimentos, contribuindo também no vosso crescimento intelectual e pessoal. Desejo a vocês grandes conquistas!!

À PGBqF pela oportunidade de colaborar para o crescimento da neurociência em nosso país.

Aos veterinários Edeones França (desde 2014), Bruno e Catarina (atualmente) pela colaboração no fornecimento e no manuseio dos animais, por toda atenção e ensinamentos recebido.

À minha *Tia Ana Ludmila e sua Família*, que sempre foram meu porto seguro, diante de tantas batalhas travadas no percurso dessa formação.

À minha terapeuta, *Joana Caroline*, sem seus cuidados e suporte no âmbito da minha saúde mental, eu não chegaria até aqui. Seu apoio no aspecto emocional, me permitiu desenvolver uma saúde mental adequada e um equilíbrio emocional, me ajudou a ser resiliente e não desistir, de um sonho.

Aos meus *amigos e irmãos na fé*, que sempre intercederam por mim e acreditaram no meu potencial, mesmo quando eu não enxergava força e qualidades em mim. Não citarei nomes, mas vcs estarão sempre em meu coração.

Quero compartilhar essa conquista com vocês! Se hoje estou aqui é porque vocês acreditaram no meu potencial e caminharam ao meu lado! GRATIDÃO, AMO VOCÊS!!

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.
Isaac Newton

RESUMO

Os neurônios colinérgicos, usado como umas das ferramentas principais do nosso estudo e produtores do neurotransmissor acetil-colina (ACh), desempenham papel essencial na regulação de processos fisiológicos no organismo de mamíferos. O exercício físico regular exerce efeitos benéfico sobre o desenvolvimento e funções cerebrais. A desnutrição continua a ser uma preocupação global, afetando milhões de pessoas em diferentes partes do mundo, e seu estudo experimental ajuda a entender seus efeitos sobre o funcionamento adequado do organismo em todas as suas dimensões. **Neste trabalho**, estudou-se, em ratos exercitados e sedentários, os efeitos da **aplicação tópica cortical** do agonista colinérgico **Pilocarpina** e do antagonista **Escopolamina** sobre a propagação do fenômeno eletrofisiológico denominado **Depressão Alastrante Cortical** (DAC). Adicionalmente, investigou-se a influência da **desnutrição** na ação desses fármacos. Os resultados confirmaram que o exercício físico em esteira desacelerou a propagação da DAC. À semelhança do observado previamente com a aplicação sistêmica da pilocarpina, no presente estudo a aplicação tópica de pilocarpina na concentração de 10 mg/ml, mas não na de 5 mg/ml, desacelerou significativamente, de forma reversível, a propagação da DAC. Ao contrário, a escopolamina (também de forma dose-dependente), bem como a desnutrição, acelerou a DAC, e o efeito da escopolamina não foi impedido pela desnutrição. Concluiu-se que a modulação farmacológica da atividade colinérgica cerebral influenciou inversamente a propagação da DAC. O exercício físico, considerado neuromodulador, modulou, a ação da pilocarpina, e da Escopolamina. A eficácia da aplicação tópica cortical do agonista e do antagonista colinérgicos sugere que a ação colinérgica sobre a DAC, mesmo em tratamento farmacológico sistêmico, como estudado anteriormente, baseia-se em mecanismos localizados no tecido cerebral.

.

Palavras-chaves: Aplicação tópica cortical, Pilocarpina, Escopolamina, Depressão alastrante, Desnutrição e Exercício físico.

ABSTRACT

Cholinergic neurons, producers of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), play an essential role in regulating physiological processes in the mammalian organism. Regular physical exercise has beneficial effects on brain development and functions. Malnutrition continues to be a global concern, affecting millions of people in different parts of the world, and its experimental study helps understand its effects on the proper functioning of the organism in all of its dimensions. In this study, the effects of topically applied cholinergic agonist Pilocarpine, and antagonist Scopolamine on the propagation of the electrophysiological phenomenon called cortical spreading depression (CSD) were investigated in exercised and sedentary rats. Additionally, the influence of malnutrition on the action of these drugs was explored. The results confirmed that treadmill exercise slowed down the propagation of CSD. Similar to previous observations with systemic application of pilocarpine, in this study, the topical application of pilocarpine at a concentration of 10 mg/ml, but not at 5 mg/ml, significantly and reversibly slowed down the propagation of CSD. In contrast, scopolamine (also dose-dependently), as well as malnutrition, accelerated CSD, and the scopolamine effect on CSD was not prevented by malnutrition. It was concluded that pharmacological modulation of cerebral cholinergic activity is inversely associated with the propagation of CSD. Physical exercise, considered neuromodulator did not prevent but modulated the action of pilocarpine and scopolamine. The efficacy of cortically applied a cholinergic agonist and an antagonist suggests that the cholinergic action on CSD, even in systemic pharmacological treatment, as studied previously, is based on mechanisms located in the brain tissue.

Keywords: Pilocarpine; Scopolamine; Cortical Spreading Depression; Malnutrition; Physical exercise.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

FIGURA 1: Efeitos da alimentação na cognição	13
FIGURA 2: Mapa estrutural do arranjo epigenético e alterado do cérebro como mecanismos de psicopatologia.	14
FIGURA 03: Registros de EEG obtidos após administração de pilocarpina	14
FIGURA 4: Sequência de eventos (A-F) que ocorrem durante o fenômeno reversível da depressão alastrante cortical (DAC).	15

ARTIGO

FIGURA 1. Representação esquemática dos 12 grupos de animais	16
FIGURA 2: Esquema do registro eletrofisiológico da DAC	17
FIGURA 3- Evolução do Peso corporal	18
FIGURA 4- Registros do eletrocorticograma (E) e da variação lenta de potencial (P), típicos da depressão alastrante cortical (DAC)	20
FIGURA 5: Variáveis eletrofisiológicas (Velocidade de propagação, Amplitude e Duração) da depressão alastrante cortical (DAC)	21
FIGURA 6: Efeito do tratamento tópico cortical com Pilocarpina em ratos desnutridos e sedentários	21
FIGURA 7: Efeito da aplicação tópica de Escopolamina em ratos nutridos sedentários e exercitados	23
FIGURA 8: Efeito do tratamento Tópico de Escopolamina em ratos desnutridos e sedentários	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Descrição dos 4 grupos experimentais, de acordo com a condição física (exercitado ou sedentário) e com o tratamento tópico (pilocarpina ou escopolamina).	27
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina
ANOVA - Análise de Variância
DAC – Depressão Alastrante Cortical
DPN- Dia pós-natal
EEG- Eletrocorticograma
ELT – Epilepsia de Lobo Temporal
KCl – Cloreto de potássio
M1 - Subtipo de receptor Muscarínico
PND - Post natal day
SNC - Sistema Nervoso Central
SE - Status epilepticus
VLV – Variação Lenta de Voltagem.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	16
2.2 ATIVIDADE COLINÉRGICA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	18
2.2.1 PILOCARPINA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	19
2.2.2 ESCOPOLAMNIA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	21
2.3 RECEPTORES MUSCARINICOS E SUAS INTERAÇÕES	22
2.4 EXERCICIO FISICO	23
2.5 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL	24
3 HIPOTESE DO ESTUDO	26
4.OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivo específico	27
5. REFERÊNCIAS	28
6 ARTIGO -	34
7 CONCLUSÕES	50
ANEXOS – Parecer do comitê de ética.	55
-Confirmação de submissão do Artigo	56

1.INTRODUÇÃO

As diversas desordens neurológicas e a não conformidade nas diversas condições nutricionais representam desafios significativos para a saúde pública em muitos países em desenvolvimento, acarretando implicações econômicas e socioculturais. Acredita-se que as modificações resultantes da combinação dessas condições podem intensificar efeitos prejudiciais que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) (Porto et al, 2010). Dado que ambas as condições são prevalentes em nossa sociedade, é incontestável explorar mais a fundo essas situações e compreender suas ramificações nos níveis comportamental, eletrofisiológico, bioquímico e celular.

Múltiplas evidências têm demonstrado a intervenção benéfica do exercício físico sobre aspectos estruturais e funcionais do sistema nervoso. A atividade física, ao longo da vida, tem sido proposta como abordagem preventiva e terapêutica. Dados na literatura apontam que o exercício físico regular está associado a processos adaptativos que trazem efeitos benéficos ao funcionamento cerebral, envolvendo aprendizagem, potenciação de longo prazo e memória (Ogonovszky *et al*, 2005); (Van Praag *et al*, 1999); (Radak *et al*, 2001;).

O exercício físico parece contribuir para preservação da integridade cerebrovascular, aumentando o crescimento dos capilares cerebrais; pode aumentar as conexões dendríticas (Lucas *et al*; 2012) (Ding *et al*, 2006), assim como a eficiência do processamento de informações no sistema nervoso central (Berchtold *et al* 2010); (Lucas *et al* 2012).

Ao longo da vida, muitas são as alterações neurológicas que passam a afetar os seres humanos, como por exemplo, nas primeiras décadas de vida, a Epilepsia; depois, os acidentes vasculares cerebrais e as doenças de Parkinson e de Alzheimer, dentre outras.

Um modelo muito utilizado para o estudo de algumas desordens neurológicas e também como um método convulsivante capaz de provocar alterações morfofuncionais consiste em utilizar o agonista colinérgico pilocarpina (Turski. *et al*, Review, 1989). A Pilocarpina, um alcaloide derivado do Jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), apresenta ação agonista colinérgica muscarínica. A injeção intracerebral ou sistêmica deste composto (por via sistêmica, em doses >300mg/kg) promove episódios comportamentais de natureza epileptogênica, que levam a um estado de mal epilético, caracterizado por crises encadeadas, que se repetem de forma prolongada (Cavalheiro *et al*, 1991.). Quando aplicada em doses menores, a pilocarpina não induz convulsões, mas é capaz de afetar fenômenos eletrofisiológicos cerebrais, como a Depressão Alastrante cortical, objeto do nosso estudo (ver abaixo) (Mendes-da-silva, *et al* 2018).

Assim, o emprego de agonistas e antagonistas colinérgicos muscarínicos (respectivamente, pilocarpina e escopolamina) tem sido de grande valia em estudos experimentais envolvendo alterações da excitabilidade cerebral. A escopolamina tem seu efeito demonstrado na redução de episódios de espasmo muscular; a mesma é um composto quaternário oriundo dos alcaloides da *Beladonna*, com ações central e periférica.

Existe uma carência de estudos com agentes farmacológicos eficazes em retardar processos neurodegenerativos. Inúmeros relatos sugerem, por outro lado, que a atividade física regular também pode minimizar o risco de comprometimento neurológico em condições como esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, doença de Parkinson e epilepsia (Cotman e Berchtold, 2002); (Eldar e Marincek, 2000); (Smith e Zigmond 2003); (Sosnoff *et al*, 2014). Sendo assim, estudos pregressos mostram que a associação da Pilocarpina, potente agonista colinérgico, com o exercício físico permite analisar a modulação da vulnerabilidade neuronal proveniente de insultos epiléticos (Vannucci *et al*, 2016). Nesse contexto, os estudos que envolvem a aplicação tópica cerebral de drogas colinérgicas em ratos submetidos à atividade física são muitos escassos, particularmente os que analisam o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC).

A DAC foi descrita originalmente como uma redução ("depressão") da atividade elétrica cerebral (tanto a espontânea como a provocada), em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto da superfície cerebral. Essa resposta se propaga como uma "onda" reversível (toda a atividade se recupera após alguns minutos) acompanhada do aparecimento de uma "variação lenta de voltagem" (VLV), característica do fenômeno (Leão, 1944; Leão, 1947). Essa propagação se dá de forma concêntrica a partir do ponto estimulado. Em todos os vertebrados onde já se registrou a DAC, sua velocidade de propagação tem se mostrado notavelmente baixa (de 2 a 5 mm/min), em comparação com a ordem de grandeza da propagação dos impulsos nervosos em axônios (até dezenas de m/s). Isto levou alguns autores a postular um mecanismo humoral para a propagação do fenômeno. Esse mecanismo seria baseado na liberação de um ou mais fatores químicos pelas células neurais, no momento em que elas fossem submetidas à DAC.

Nosso grupo de pesquisa na UFPE, tem estudado alguns efeitos da pilocarpina sobre a DAC em animais tratados com doses subconvulsivantes dessa substância, administrada por via intraperitoneal, como por exemplo: diminuição da velocidade de propagação da DAC e da amplitude do ECoG, baseado na dose e/ou concentração utilizada (Francisco e Guedes, 2018); (Mendes-da-Silva, *et al*, 2018). Baseado nesses trabalhos anteriores, decidiu-se no presente estudo analisar o efeito da aplicação tópica de fármacos colinérgicos (agonistas ou

antagonistas), em baixas concentrações, no córtex cerebral de ratos exercitados e sedentários, em diferentes condições nutricionais; sendo assim, o objetivo deste estudo (ver mais abaixo) foi analisar a interação entre o exercício físico e a manipulação do sistema colinérgico (com a aplicação de um seu agonista e um antagonista) sobre a propagação da DAC, em ratos Wistar em diferentes estados nutricionais, baseado na seguinte hipótese: “A atividade colinérgica cerebral influencia inversamente a propagação da DAC, e esse efeito é modulado pelo exercício físico independente do estado nutricional.”.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A associação entre as condições nutricionais e o sistema nervoso tem sido temática de extenso estudo, revelando a complexidade das interações entre a nutrição e o funcionamento cerebral. A nutrição desempenha um papel essencial no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, influenciando desde processos neuroquímicos até a plasticidade sináptica. A adequada oferta de nutrientes, como vitaminas, minerais, ácidos graxos e aminoácidos, é essencial para o funcionamento eficiente do sistema nervoso. A falta ou excesso de determinados nutrientes pode afetar a síntese de neurotransmissores, prejudicando a comunicação entre os neurônios (Gomez e Pinilla, 2008- FIGURA 1)

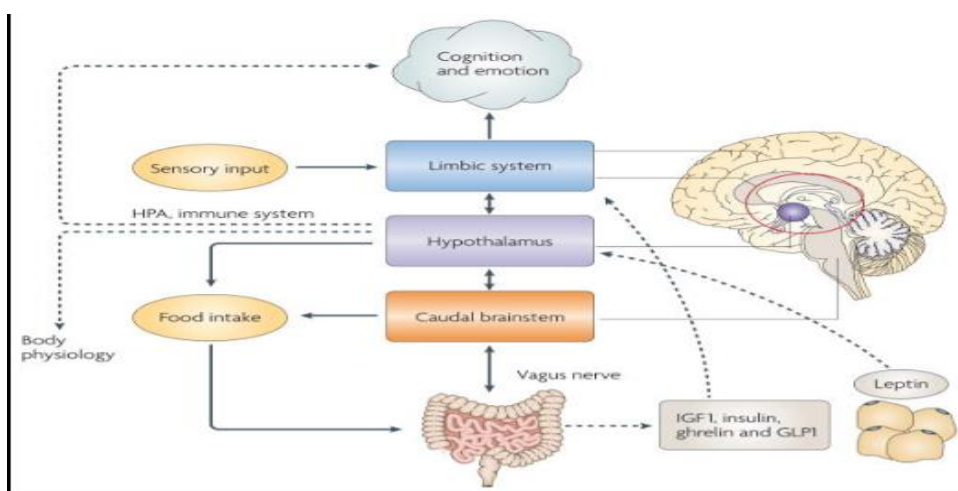


FIGURA 1: Efeitos da alimentação na cognição. Os circuitos neurais compreendidos no comportamento alimentar apresentam uma coordenação precisa com os centros cerebrais que modulam a homeostase energética e a função cognitiva. A ingestão de alimentos desencadeia a liberação de hormônios ou peptídeos, como a insulina e o peptídeo semelhante ao glucagon

1 (GLP1), na circulação; essas substâncias podem então atingir centros como o hipotálamo e o hipocampo e ativar vias de sinalização que promovem a atividade sináptica e contribuem para a aprendizagem e a memória. As ações positivas da leptina na plasticidade sináptica dependente do hipocampo - ou seja, suas ações na função dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e na facilitação da potenciação de longo prazo - são bem caracterizadas. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) é produzido pelo fígado e pelo músculo esquelético em resposta a sinais derivados do metabolismo e do exercício. **FONTE:** Adaptado de Gomez e Pinilla, 2008

Durante a infância, um período crítico para o desenvolvimento cerebral, a desnutrição pode acarretar efeitos duradouros no SNC (Morgane *et al.*, 1993). A má nutrição nessa fase pode resultar em alterações estruturais e funcionais no cérebro, impactando o desempenho cognitivo ao longo da vida (Prado e Dewey, 2014). A plasticidade sináptica, vital para a aprendizagem e memória, é suscetível à influência dos hábitos alimentares. Dietas ricas em antioxidantes e ácidos graxos ômega-3 têm sido associadas a uma melhor plasticidade sináptica, enquanto dietas ricas em gorduras saturadas e açúcares podem ter efeitos prejudiciais (WU *et al.*, 2004; Molteni *et al.*, 2002).

A relação entre a dieta e a saúde mental é uma área de crescente interesse. Estudos sugerem que uma dieta equilibrada pode desempenhar um papel na prevenção de distúrbios neuropsiquiátricos, como a depressão e a ansiedade de acordo com a Figura 2 (LAI *et al.*, 2014).

A conexão entre as condições nutricionais e o sistema nervoso é evidente, influenciando não apenas a função cognitiva, mas também a saúde mental. Preservar uma dieta equilibrada ao longo da vida é crucial para promover a saúde cerebral e prevenir potenciais complicações. O entendimento dessas interações nutricionais no contexto do sistema nervoso proporciona “*insights*” valiosos para estratégias de promoção da saúde cerebral e qualidade de vida.

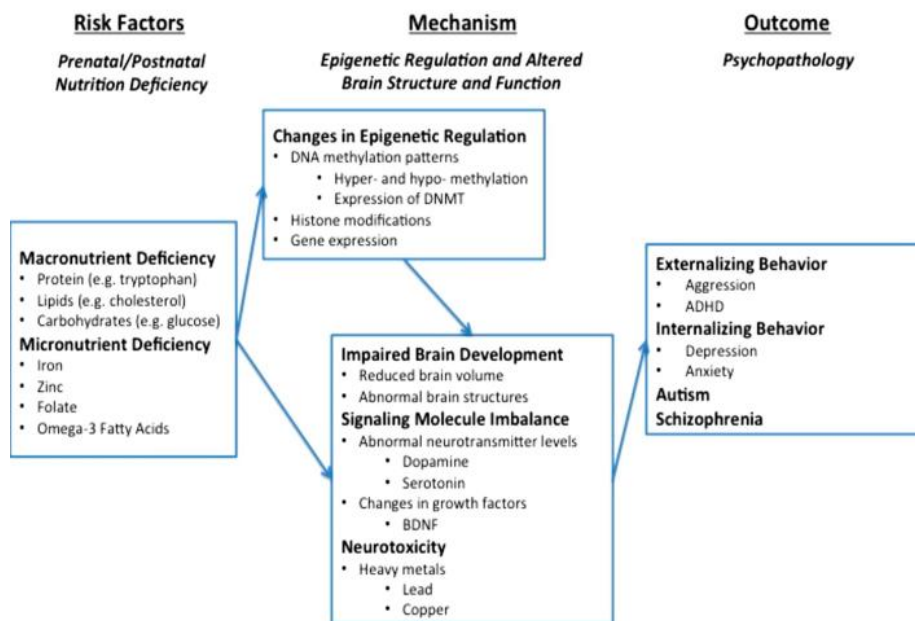


FIGURA 2: Mapa estrutural do arranjo epigenético e alterado do cérebro como mecanismos de psicopatologia. FONTE: Adaptado de Liu *et al* (2015).

A conexão entre as condições nutricionais e o sistema nervoso é evidente, influenciando não apenas a função cognitiva, mas também a saúde mental. Manter uma dieta equilibrada ao longo da vida é crucial para promover a saúde cerebral e prevenir potenciais complicações. O entendimento dessas interações nutricionais no contexto do sistema nervoso proporciona insights valiosos para estratégias de promoção da saúde cerebral e qualidade de vida.

2.2 ATIVIDADE COLINÉRGICA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A atividade colinérgica possui uma importância crucial no funcionamento do sistema nervoso central (SNC), afetando diversos processos fisiológicos e comportamentais de maneira significativa. O neurotransmissor colinérgico acetilcolina (ACh) está amplamente distribuído no cérebro e desempenha um papel importante em várias funções, como cognição, emoção e movimento. A modulação colinérgica desempenha um papel essencial na regulação da atenção, aprendizado e memória. Pesquisas têm evidenciado que a estimulação colinérgica pode aprimorar o desempenho cognitivo em tarefas de memória e atenção (Hasselmo e Sarter, 2011). Além disso, distúrbios neuropsiquiátricos, como a doença de Alzheimer, têm sido associados à disfunção colinérgica, em que a perda de neurônios colinérgicos no córtex cerebral está relacionada ao declínio cognitivo (Davies e Maloney 1976).

A atividade colinérgica tem um papel relevante na regulação do humor e do estado emocional. Pesquisas sugerem que a regulação colinérgica está envolvida na resposta ao estresse e no controle do humor (Mineur *et al* 2013). Mudanças na atividade colinérgica têm sido relacionadas a distúrbios do humor, como a depressão e a ansiedade (Drevets *et al* 2008). Além do mais, a atividade colinérgica está relacionada com a regulação do sistema motor, mediando a transmissão de sinais entre os nervos e os músculos, bem como o controle do movimento. A ACh desempenha o papel de neurotransmissor nas células nervosas responsáveis pelos movimentos na medula espinhal, transmitindo sinais do sistema nervoso central para os músculos periféricos, e coordenando tanto movimentos voluntários quanto involuntários (Grillner e Robertson, 2015).

Finalmente, a atividade colinérgica no sistema nervoso central exerce um papel fundamental na regulação de vários processos fisiológicos e comportamentais. Compreender os mecanismos subjacentes à atividade colinérgica é crucial para o avanço de abordagens terapêuticas no tratamento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos.

2.2.1 PILOCARPINA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A pilocarpina, um potente agonista colinérgico muscarínico, pode provocar alterações comportamentais e eletrofisiológicas semelhantes às encontradas na epilepsia do lobo temporal do homem (Drevets *et al.* 2008). A injeção intracerebral ou sistêmica (em doses >300mg/kg) deste composto propicia episódios comportamentais de natureza epileptogênica, que culminam em um estado de mal epilético (Turski *et al.*, 1983a, 1983b), conhecido pela sigla SE (do Latim “status epilepticus”). A utilização de pilocarpina pode induzir estresse oxidativo e provocar alterações comportamentais referentes à ansiedade e distúrbios de memória, bem como alterações eletrográficas semelhantes às encontradas na epilepsia do lobo temporal do ser humano. (Oliveira *et al*, 2017); Do ponto de vista clínico é indicada como terceira linha de tratamento no controle do glaucoma (pressão intraocular elevada), com eficácia comprovada (LEE e Higginbotham, 2005); (Petsas *et al*, 2017) e no tratamento dos sintomas da boca seca e outras condições xerostômicas (Montoya *et al* 2016), como na síndrome de Sjögren (Shih *et al* 2017); (Montoya *et al* 2016); (Watanabe *et al* 2018).

No âmbito experimental a pilocarpina é utilizada como modelo químico para indução de epilepsia em roedores. A administração sistêmica de Pilocarpina em animais desencadeia atividade epilética, proporcionando insights valiosos para o entendimento da fisiopatologia e potenciais estratégias terapêuticas em condições epiléticas (Curia *et al* 2008).

As alterações comportamentais e eletrográficas, que ocorrem no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, são semelhantes às que ocorrem na epilepsia do lobo temporal em humanos (Turski *et al* 1983a, 1983b); como observado na FIGURA 03.

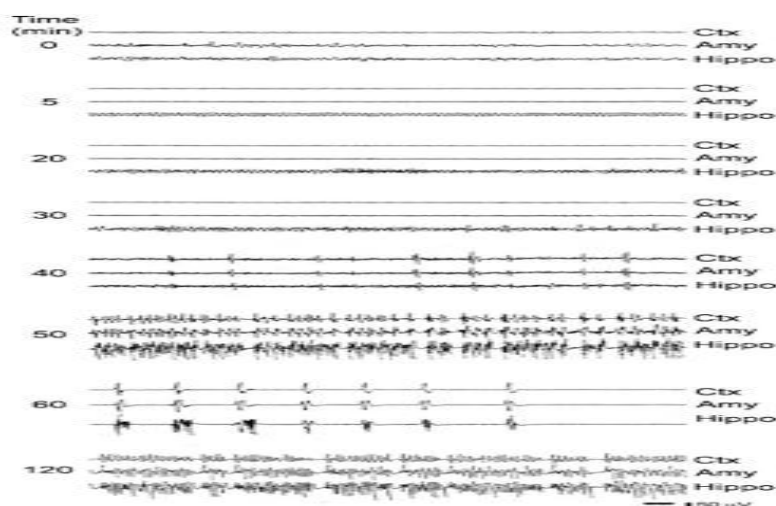


FIGURA 03: Registros de EEG obtidos após administração de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.)

FONTE: Adaptado de TURSKI *et al.*, 1983 a.

Tais alterações podem ser subdivididas em três períodos distintos: i) período agudo – até 24h; ii) período silencioso (entre 4 a 44 dias) – com temporária normalização eletroencefalográfica e comportamental; iii) período crônico (torna-se permanente durante o resto da vida do animal) – convulsões recorrentes espontâneas (Cavalheiro *et al* 1991); (Scorza *et al* 2009).

A Pilocarpina pode modular a neurotransmissão e a plasticidade sináptica em diversas regiões do SNC. A ativação colinérgica induzida pela Pilocarpina pode influenciar a liberação de neurotransmissores e modificar a eficácia sináptica, impactando diretamente a função cerebral. (Hamilton *et al*, 1997) Embora a Pilocarpina seja utilizada como uma ferramenta valiosa em pesquisas experimentais, seu uso contínuo e em doses elevadas (acima de 95 mg/kg) pode apresentar desafios para a saúde neurológica. Efeitos adversos, como toxicidade neuronal, têm sido relatados em estudos que exploram a resposta do SNC à Pilocarpina (Moura *et al* 2021). Desde então, entende-se que a Pilocarpina representa uma ferramenta valiosa para a pesquisa neurocientífica, proporcionando “*insights*” importantes sobre os mecanismos colinérgicos e a fisiopatologia de condições neurológicas, especialmente em modelos experimentais de epilepsia. No entanto, é crucial abordar os potenciais desafios associados ao uso dessa substância, considerando seus efeitos sobre a saúde neurológica.

A possibilidade de a pilocarpina promover SE mostra-se associada à ativação de receptores muscarínicos. O subtipo M1 tem sido relacionado como principal incluso nas crises convulsivas induzidas por pilocarpina. Camundongos geneticamente modificados, desprovidos do receptor M1, não apresentaram crises clônico-tônicas comparados a outros que possuem os outros quatro subtipos (Hamilton *et al*, 1997); (Master *et al* 2003).

2.2.2. ESCOPOLAMINA E SISTEMA NERVOSO

A Escopolamina, um alcaloide detectado em plantas da família Solanaceae, tem sido muito estudada devido as suas ações sobre o sistema nervoso central (SNC). Este fármaco, conhecido por suas propriedades anticolinérgicas, desenvolve um papel crucial na modulação da neurotransmissão colinérgica, resultando em diversos efeitos sobre as funções cerebrais. O principal efeito da Escopolamina é a inibição competitiva dos receptores muscarínicos de acetilcolina (ACh) no SNC. Essa interação pode desenvolver algumas desordens em diferentes aspectos do funcionamento cerebral, incluindo a regulação do humor, da memória e das funções cognitivas (Rusted e Trawley 2006).

Em modelos experimentais, a administração de Escopolamina tem sido associada a prejuízos na memória e no aprendizado, sugerindo seu potencial como um recurso valioso no estudo dos mecanismos envolvidos nessas funções (Blokland *et al*, 1992). Além disso, a Escopolamina é utilizada como um gerador de efeitos colinérgicos reduzidos em pesquisas neurofarmacológicas. Estudos em animais tratados com Escopolamina têm contribuído para a compreensão dos mecanismos colinérgicos envolvidos em processos cognitivos e comportamentais (Jones e Yakel, 1997).

É importante destacar que, apesar de seu valor em estudos experimentais, o uso da Escopolamina em níveis elevados ou prolongados pode resultar em efeitos adversos, incluindo comprometimento cognitivo e delírios. Portanto, a compreensão dos efeitos da Escopolamina no SNC não apenas fornece dados importantes para a pesquisa, mas também destaca a necessidade de considerações cautelosas em aplicações clínicas potenciais. Sendo assim, a Escopolamina, como antagonista colinérgico, desempenha um papel significativo na pesquisa neurocientífica, fornecendo informações cruciais sobre os mecanismos envolvidos nas funções cerebrais.

2.3 RECEPTORES MUSCARINICOS E SUAS INTERAÇÕES:

Os receptores muscarínicos, membros da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), desempenham um papel fundamental na transmissão colinérgica e estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo contração muscular, modulação da frequência cardíaca, secreção glandular e regulação da função cognitiva. (Torres, 2018) Esses receptores são ativados pelo neurotransmissor acetilcolina e são alvos de uma ampla gama de drogas farmacêuticas, tornando-os importantes alvos terapêuticos em várias condições clínicas. (Caulfield e Birdsall, 1998) Nosso estudo permite explorar as características estruturais e as interações dos receptores muscarínicos, destacando sua importância na fisiologia e farmacologia.

Os receptores muscarínicos são divididos em cinco subtipos conhecidos como M1 a M5, e são expressos em diferentes tecidos e regiões do sistema nervoso central e periférico. Cada subtipo de receptor possui características estruturais distintas e padrões de expressão que determinam suas funções específicas. Por exemplo, os receptores M1 estão predominantemente localizados no córtex cerebral e no hipocampo, onde desempenham um papel crucial na memória e na cognição, enquanto os receptores M2 são abundantes no coração e estão envolvidos na modulação da frequência cardíaca. (Torres, 2018)

A ativação dos receptores muscarínicos ocorre quando a acetilcolina se liga ao sítio de ligação do receptor, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares mediada pela ativação de proteínas G. Esses receptores são capazes de interagir com diferentes subunidades de proteínas G, resultando em uma variedade de respostas celulares. (Caulfield e Birdsall, 1998) Por exemplo, a ativação dos receptores M1, M3 e M5 está associada à ativação da fosfolipase C e à subsequente liberação de cálcio intracelular, enquanto a ativação dos receptores M2 e M4 está ligada à inibição da adenilato ciclase e à diminuição dos níveis de AMP cíclico. (Ver Wess; 2004)

Além da ativação direta pelos ligantes endógenos, os receptores muscarínicos também podem interagir com outras proteínas e moléculas, modulando assim sua atividade e sinalização. Por exemplo, interações com proteínas quinases, como a quinase ativada por mitógenos (MAPK), podem modular a atividade dos receptores muscarínicos e influenciar sua função biológica. (Torres, 2018)

Os receptores muscarínicos desempenham um papel central na regulação de uma variedade de processos fisiológicos e são alvos importantes para o desenvolvimento de drogas terapêuticas em diversas condições médicas, incluindo distúrbios neurológicos, cardiovasculares e gastrointestinais. (ver Thomsen; *et al* 2018) O entendimento das características estruturais e das interações dos receptores muscarínicos é fundamental para o

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos de sinalização colinérgica.

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO

A relação entre qualidade de vida e atividade física, na sociedade atual, tem sido foco de discussões formais e informais. Os benefícios progressivos que o exercício físico proporciona tem influenciado de forma direta e indireta na promoção de saúde dos indivíduos. Pelos indicadores apresentados quanto aos efeitos benéficos que produz, a atividade física vem sendo gradativamente inserida em programas de promoção de hábitos saudáveis de vida, de prevenção e mesmo de controle de doenças (Mitnitsk *et al*, 2005 apud Kayser *et al*, 2012), considerando que a prática de atividade física regular reduz o risco de mortes prematuras, doenças do coração, acidente vascular cerebral, câncer de cólon, mama e diabetes tipo II. Atua no controle de valores pressóricos e, conseqüentemente, da pressão arterial, previne o ganho de peso (diminuindo o risco de obesidade), auxilia na prevenção ou redução da osteoporose, promove bem-estar, reduz o estresse, a ansiedade e a depressão, entre outros (Who *et al*, 2004). Estudos têm de forma coerente demonstrado que o exercício físico está associado a melhorias na função cognitiva, incluindo aspectos como memória, atenção e processamento mental.

Pesquisas indicam que o exercício regular pode estimular o crescimento de novos neurônios, um fenômeno conhecido como neurogênese, principalmente no hipocampo, uma região crucial para a memória (Van Praag *et al*, 1999); (Hillman *et al*, 2008). O exercício físico regular pode atuar como um fator protetor contra doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer e o Mal de Parkinson. Mecanismos propostos incluem a redução do estresse oxidativo, a melhoria do fluxo sanguíneo cerebral e a promoção da plasticidade sináptica (Cotman *et al* 2007) ;(Ahlskog *et al*, 2011).

Em suma, o exercício físico manifesta-se como uma estratégia eficaz para promover a saúde do sistema nervoso central. A relação entre a atividade física e melhorias cognitivas, redução do estresse e proteção contra doenças neurodegenerativas destaca a importância do exercício físico regular para a saúde cerebral. (ver Karacabey, 2005 para uma revisão) Sendo assim é importante entender os mecanismos neurobiológicos subjacentes que fortalecem a fundamentação para a prescrição de exercícios como uma abordagem terapêutica e preventiva no contexto de benefícios e evolução ao sistema nervoso central.

2.5 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A Depressão Alastrante cortical (DAC) foi descrita pela primeira vez pelo neurocientista brasileiro Aristides Azevedo Pacheco Leão como um fenômeno eletrofisiológico, que se propaga como uma “onda” reversível de redução (depressão) da atividade elétrica cerebral, em resposta à estimulação elétrica, química ou mecânica de um ponto da superfície cortical Leão (1944a). A DAC é acompanhada do aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno (Leão, 1947). A diminuição da atividade elétrica dura alguns minutos e se propaga (alastra) lentamente (velocidades da ordem de poucos mm/min) de forma concêntrica por todo o córtex. À medida que o fenômeno se propaga para regiões corticais cada vez mais afastadas do ponto inicialmente deprimido, a atividade elétrica começa a se recuperar a partir desse ponto, também de forma concêntrica e ao final de 10 a 15 minutos todo o tecido encontra-se recuperado (Leão, 1944a), de acordo com a FIGURA 4.

A partir da primeira descrição da DAC muitos estudos têm sido feitos para esclarecer os processos responsáveis por este fenômeno, principalmente quanto à sua repercussão frente a ação de agentes colinérgicos (Guedes e Vasconcelos, 2008) da desnutrição (Guedes *et al*, 1987) (Rocha-de-melo e Guedes 1997), e do exercício físico (Monteiro *et al* 2011); (Batista-de-oliveira *et al*, 2012).

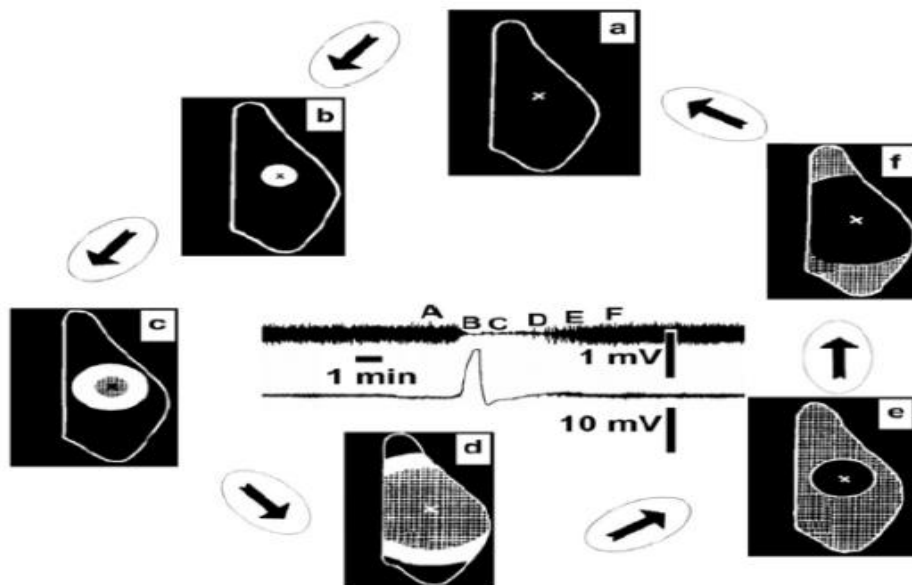


FIGURA 4: Sequência de eventos (A-F) que ocorrem durante o fenômeno reversível da depressão alastrante cortical (DAC). Em A, x representa o ponto do tecido cortical que é estimulado, deflagrando um episódio de DAC.

O círculo branco marcado em B mostra a área inicialmente deprimida, que se propaga concentricamente para outras áreas do córtex (etapas C e D). O círculo em preto mostrado em E e F indica as áreas recuperadas após a DAC. A área quadriculada representa a refratariedade cortical a uma nova estimulação após a DAC, e antes da total recuperação. Percebe-se que a recuperação é gradativa e também ocorre de forma concêntrica até finalmente retornar à condição inicial pré-DAC, mostrada em A. Ao centro, é mostrado o eletrocorticograma (ECoG) com a variação lenta de potencial (VLV) da DAC. Nota-se, no eletrocorticograma, a redução da amplitude das ondas eletrográficas, no momento em que ocorre a VLV (B, C e D), característica da DAC.

FONTE: Adaptado de GUEDES, 2011

A deflagração da DAC tem sido evidenciada não apenas no córtex cerebral de aves, répteis e anfíbios, como também no cérebro de mamíferos, incluindo o homem (BERGER *et al.*, 2008). O fenômeno foi identificado em várias estruturas do Sistema Nervoso Central como núcleo caudado, tubérculo quadrigêmeo, bulbo olfatório, córtex cerebelar, teto óptico e medula espinhal (Leão e Martins Ferreira 1958,1961); (Fifkova *et al.*, 1961); (Streit *et al.*, 1995); (Gorji e Sperckmann 2004); (Guedes *et al.* 2005); (Berger *et al.*, 2008). Nesse sentido, situações experimentais que possam alterar a susceptibilidade do tecido à DAC podem disponibilizar dados importantes para o entendimento deste fenômeno, cuja relevância clínica reside no fato dele estar relacionado a algumas doenças neurológicas humanas como injúria cerebral, enxaqueca, epilepsia e isquemia cerebral (Somjen *et al.* 1992; (Dreier *et al.*, 2011); Torrente *et al.*, 2014). (Fifkova *et al.*, 1961).

Conclui-se que modelos experimentais como o da Depressão Alastrante Cortical abrem caminhos para análise de várias doenças neurológicas; entende-se também que a condição nutricional deficiente pode causar alterações neurológicas que implicam no desenvolvimento do SNC; Frente a essas questões, sabe-se que a atividade física apresenta um papel protetor no cérebro e que mediante a quantidade de agentes farmacológicos existentes para minimizar danos cerebrais, a atividade física tem sido indicada como padrão ouro, por não apresentar efeitos adversos ao cérebro e ser de ação natural; podendo assim minimizar também os efeitos colaterais dos fármacos. Observou-se também que quanto ao uso da via de administração farmacológica, a aplicação tópica, mostrou como o fármaco pode agir diretamente no SNC, sem precisar passar por barreiras sistêmicas, permitindo um efeito imediato e reversível.

3. HIPÓTESE DO PRESENTE ESTUDO

A atividade colinérgica cerebral influencia inversamente a propagação da DAC, e esse efeito é modulado pelo exercício físico independente do estado nutricional.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Analisar, eletrofisiologicamente, os efeitos da associação exercício+aplicação tópica cortical de fármacos colinérgicos (agonista ou antagonista) sobre a DAC, em ratos Wistar em desenvolvimento, nutridos e desnutridos.

4.2. Específicos

- Acompanhar a evolução do peso corporal dos filhotes, como indicador do desenvolvimento do organismo em diferentes condições nutricionais;
- Investigar o efeito da aplicação tópica cortical de um agonista (pilocarpina) e um antagonista colinérgico (escopolamina) sobre a DAC;
- Analisar a possível influência do exercício físico em diferentes condições nutricionais sobre os efeitos acima especificados.

5. REFERÊNCIAS

A.gorji; Speckmann E.J, spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues, Eur. **J. Neurosci.** 19 (2004) 3371-3374.

Ahlskog J; Eric; Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson disease? **Neurology**, v. 77, n. 3, p. 288-294, 2011.

Batista-de-Oliveira, M., Lopes, A. A. C., Mendes-da-Silva, R. F., & Guedes, R. C. A. (2012). Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Experimental gerontology**, 47(6), 452-457.

Berchtold N.C, Castello N, Cotman C.W; Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 2010 19; 167: 588-597. **Neuroscience**.2010.02.050.pub 2010 feb 26.

Berger, M., Speckmann, E. J., Pape, H. C., & Gorji, A. (2008). Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. **Cephalalgia**, 28(5), 558-562.

Blokland, Arjan; Honig, Wiel; Raaijmakers, Wijnand G.M; Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. **Psychopharmacology**, v. 109, p. 373-376, 1992.

Bymaster, F. P., Carter, P. A., Yamada, M., Gomeza, J., Wess, J., Hamilton, S. E., ... & Felder, C. C. (2003). Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. **European journal of neuroscience**, 17(7), 1403-1410.

Caulfield M.P, Birdsall N.J.M. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, 50(2), 279-290.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L.; Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**.1991 32:778-82

Cotman C.W; Berchtold N.C (2002); Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends neurosci.** 25:295-301

Cotman, C.W.; Berchtold, N.C.; Christie L.A. (2007); Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation, **Trends in Neurosciences**, 30, pp. 464–472

Curia G., Longo D., Biagini.G., Jones, R.S.G., Avoli, M.; 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci. Methods** 172, 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>

Davies, Peter; Maloney, A. J. F; Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 308, n. 8000, p. 1403, 1976.

Ding Y.H, L.I.J, Yao W.X, Rafols J.A, Clark J.C, Ding Y; exercise preconditioning upregulates cerebral integrins and enhances cerebrovascular integrity in ischemic rats, **Acta Neuropathol.** 112:74-84 (2006)

Dreier, Jens P. The role of spreading depression, spreading depolarization, and spreading ischemia in neurological diseases. **Nature medicine**, v. 17, n. 4, pág. 439-447, 2011.

Drevets W.C; Price J.L; Furey M.L; Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain structure and function**, v. 213, p. 93-118, 2008.

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

Fifkova, E., Bures, J., Koshtoyants, O. K., Krivanek, J., & Weiss, T. (1961). Leao's spreading depression in the cerebellum of rat. **Experientia**, 17, 572–573. <https://doi.org/10.1007/BF02156433>

Francisco E.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. Front. **Neurosci.** 2018; 12:897. doi: 10.3389/fnins.2018.00897. ecollection 2018

Gómez; Pinilla F; Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nat Rev Neurosci.** 2008 Jul;9(7):568-78. doi: 10.1038/nrn2421.

Gil-Montoya, J. A., Silvestre, F. J., Barrios, R., & Silvestre-Rangil, J. (2016). Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: **A systematic review. Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, 21(3), e355.

Grillner, Sten; Robertson, Brita;The basal ganglia downstream control of brainstem motor centres—an evolutionarily conserved strategy. **Current opinion in neurobiology**, v. 33, p. 47-52, 2015.

Guedes R.C.; Andrade A.F.; CabraL F; J.E; Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 5, p. 639–42, 1987

Guedes R.C.A; Tsurudome K.; Matsumoto N; Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v. 1036, p.109-14, 2005.

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. 118–22, 2008

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**, Springer, London, p. 2343-55, 2011.

Hamilton S.E, Loose M.D, Q.I.M, Levey A.I, Hille B, Mcknight G.S, *et al*; Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:13311–13316.

Hasselmo, Michael E.; Sarter; Martin; Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 52-73, 2011

Hillman, Charles H.; ERICKSON, Kirk I.; KRAMER, Arthur F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 58-65, 2008.

Hamilton, S. E., Loose, M. D., Qi, M., Levey, A. I., Hille, B., McKnight, G. S., & Nathanson, N. M. (1997). Disruption of the M1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94(24), 13311-13316.

Jones, Susan; Yakel; Jerrel L; Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus. **Journal of physiology**, v. 504, n. Pt 3, p. 603, 1997.

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

Kayser¹, Bárbara & Miotto¹, Cascieli & Klein, Suelen & Fior¹, Laura & Borges, Aline & Batista, Juliana & Fassicollo, Carlos & Wibeling, Lia. (2012). Characterization of elderly participants in programs of regular physical activity. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas**. 11. 10.9771/cmbio. v11i3.6217.

Lai J.S; Hiles S; Bisquera A; Hure A.J; Mcevoy, M.A.J; A systematic review and meta-analysis of dietary patterns and depression in community-dwelling adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, 99(1), 181-197 (2014).

Lee D.A; Higginbotham E.J; Glaucoma and its treatment: a review. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62, n. 7, p. 691–9, 1 abr. 2005

Leão A.A.P; Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiol.** 7:359–390. (1944) doi: 10.1152/jn.1944.7.6.359. (2X)

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

Leão, A. A. P.; Martins-Ferreira H; Note on the occurrence of "spreading depression" in the hippocampus and striatum. **Ann. Acad. Brasil. Cienc.**, v. 30, 1958.

Leão, A. A. P.; Martins Ferreira H; Nota acerca da depressão alastrante no cerebelo, tubérculo quadrigemino anterior e bulbo olfativo. **An Acad Bras Cienc**, v. 33, p. 39-40, 1961

Lim B.V; Shin M.S; Lee J.M; Seo J.H; Treadmill exercise prevents GABAergic neuronal loss with suppression of neuronal activation in the pilocarpine induced epileptic rats. **J Exerc Rehabil.** 2015;11(2):80–86.

Lucas S.J, Ainslie P.N; Murrell C.J, Thomas K.N, Franz E.A, Cotter J.D; Effect of age on exercise-induced alterations in cognitive executive function: relationship to cerebral perfusion, **Exp. Gerontol.**, 47:541-551. (2012).

Mendes-da-silva R.F, Francisco E.S, Guedes RCA; Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. **Brain Res Bull.**2018;142:414- 421.
doi:10.1016/j.brainresbull.2018.09.008. epub2018sep 16.

Mineur, Y. S., Obayemi, A., Wigstrand, M. B., Fote, G. M., Calarco, C. A., Li, A. M., & Picciotto, M. R. (2013). Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety-and depression-like behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(9), 3573-3578.

Mitnitski, A., Song, X., Skoog, I., Broe, G. A., Cox, J. L., Grunfeld, E., & Rockwood, K. (2005). Relative fitness and frailty of elderly men and women in developed countries and their relationship with mortality. **Journal of the American Geriatrics Society**, 53(12), 2184-2189.

Molteni, R., Wu, A., Vaynman, S., Ying, Z., Barnard, R. J., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, 123(2), 429-440.

Monteiro, H. M. C., Silva, D. D. L. E., de França, J. P. B. D., Maia, L. M. S. D. S., Angelim, M. K. C., Santos, Â. A. D., & Guedes, R. C. A. (2011). Differential effects of physical exercise and L-arginine on cortical spreading depression in developing rats. **Nutritional Neuroscience**, 14(3), 112-118.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev.** 1993;

Moura D.M.S, Sales I.R.P, Brandão J.A, Costa M.R, Queiroz C.M; Disentangling chemical and electrical effects of status epilepticus-induced dentate gyrus abnormalities. **Epilepsy & Behavior** 121 (2021) 106575. DOI 10.1016/j.yebeh.2019.106575

Ogonovszky H, Berkes I; Kumagai S; Kaneko T; Tahara S; Goto S, Radak Z; The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, dna repair, and memory, in rat brain, **Neurochem. Int.** 46, 635- 640. 2005

Oliveira, C. V. D. (2017); Efeito da atorvastatina sobre as alterações comportamentais, histológicas e bioquímicas em camundongos C57BL/6 com status epilepticus induzido por pilocarpina (**Doctoral dissertation**, Universidade Federal de Santa Maria).

Petsas A.; Chapman G.; Stewart R; Acute angle closure glaucoma – a potential blind spot in critical care. **J Intensive Care Soc**, v. 18, n. 3, p. 244-6, 2017

Porto, J. A., Oliveira, A. G. D., Largura, A., Adam, T. S., & Nunes, M. L. (2010). Effects of epilepsy and malnutrition in the developing central nervous system: clinical aspects and experimental evidences. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, 16, 26-31..

Prado E.L.; Dewey, Kathryn G; Nutrition and brain development in early life. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 4, p. 267-284, 2014.

Radak Z, Kaneko T.S; Tahara H; Nakamoto J; Pucsok M; Sasvari C, Nyakas C, Goto S ;Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain, **Neurochem. Int.** 38:17-23 (2001).

Rocha-de-melo A.P; Guedes R.C; 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. 663–9, maio 1997.

Rusted, Jennifer M.; Trawley; Steven; Comparable effects of nicotine in smokers and nonsmokers on a prospective memory task. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 7, p. 1545-1549, 2006.

Scorza, F. A., Arida, R. M., Naffah-Mazzacoratti, M. D. G., Scerni, D. A., Calderazzo, L., & Cavaleiro, E. A. (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 81, 345-365. Shih, K. C., Lun, C. N., Jhanji, V., Thong, B. Y. H., & Tong, L. (2017). Systematic review of randomized controlled trials in the treatment of dry eye disease in Sjogren syndrome. **Journal of inflammation**, 14, 1-11.

Smith A.D, Zigmond M.J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism, **Exp. Neurol.**, 184: 31-39 (2003)

Somjen, G. G., Aitken, P. G., Czeh, G. L., Herreiras, O., Jing, J., & Young, J. N. (1992). Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, 70(S1), S248-S254.

Sosnoff J.J; Finlayson M, Mcauley E, Morrison S, Motl R.W; Home-based exercise program and fall-risk reduction in older adults with multiple sclerosis: phase 1 randomized controlled trial. **Clin rehabil.** 28:254-63. Doi: 10.1177/0269215513501092. (2014)

Streit D.S.; Ferreira Filho C.R.; Martins Ferreira H; Spreading depression in isolated spinal cord. **Journal of neurophysiology**, v. 74, n. 2, p. 888-890, 1995.

Torrente, D., Mendes-da-Silva, R. F., Lopes, A. A. C., González, J., Barreto, G. E., & Guedes, R. C. A. (2014). Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. **Neuroscience letters**, 558, 87-90..

Torres, Yuli Yohana Serna. Abstinência à cocaína e suas consequências no sistema colinérgico muscarínico. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Thomsen M; Wess, J. (2018). Novel roles for muscarinic acetylcholine receptors in organ physiology: lessons from knockout mouse models. **Pharmacological Reviews**, 70(4), 981-1010.

Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W. A., Bortolotto, Z. A., & Cavalheiro, E. A. (1989). Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3(2), 154-171.

Vannucci C.D, lopin GM, Almeida VS, Amado D, Arida RM. Effects of different physical exercise programs on susceptibility to pilocarpine-induced seizures in female rats. **Epilepsy & Behavior** 64 (2016) 262–267)

Van praag h, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences** November 9, 1999 96 (23):13427-31. DOI:10.1073/pnas.96.23.13427.

Watanabe, M., Yamada, C., Komagata, Y., Kikuchi, H., Hosono, H., & Itagaki, F. (2018). New low-dose liquid pilocarpine formulation for treating dry mouth in Sjögren's syndrome: clinical efficacy, symptom relief, and improvement in quality of life. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, 4, 1-6..

WESS, J. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 44(1), 423-450.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); Physical activity: direct and indirect health benefits. Disponível em: <www.who.int/hpr/physactive/health.benefits.shtml>. Acesso em: 3 out. 2004

WU A., Ying Z., Gomez Pinilla F.. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma**, 21(10), 1457-1467 (2004)

6. ARTIGO 1

A ser submetido na revista: "Experimental Brain Research" (Fator de Impacto: 2.0)

Effects of topical cortical application of a cholinergic agonist and an antagonist on the propagation of cortical spreading depression: modulation by exercise and malnutrition

Authors: Catarina Nicácio dos **Santos**¹, Maiara Eduarda de Souza **Pereira**², Rian Ricardo Henrique da **Silva**² and Rubem Carlos Araújo **Guedes**^{2CA}

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

¹Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^{CA}= Corresponding author. Address as #¹ above

e-mail: guedes.rca@gmail.com or rubem.guedes@ufpe.br

Abstract

Cholinergic neurons, producers of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), play an essential role in regulating physiological processes in the mammalian organism. Regular physical exercise has beneficial effects on brain development and functions. Malnutrition continues to be a global concern, affecting millions of people in different parts of the world, and its experimental study helps understand its effects on the proper functioning of the organism in all of its dimensions. In this study, the effects of topically applied cholinergic agonist Pilocarpine and antagonist Scopolamine on the propagation of the electrophysiological phenomenon called cortical spreading depression (CSD) were investigated in exercised and sedentary rats. Additionally, malnutrition's influence on these drugs' actions was explored. The results confirmed that treadmill exercise slowed down the propagation of CSD. Similar to previous observations with systemic application of pilocarpine, in this study, the topical application of pilocarpine at a concentration of 10 mg/ml, but not at 5 mg/ml, significantly and reversibly slowed down the propagation of CSD. In contrast, scopolamine (also dose-dependently), as well as malnutrition, accelerated CSD, and the scopolamine effect on CSD was not prevented by malnutrition. It was concluded that pharmacological modulation of cerebral cholinergic activity is inversely associated with the propagation of CSD. Physical exercise, considered neuromodulator, did not prevent but modulated the action of pilocarpine and scopolamine. The efficacy of topically applied a cholinergic agonist and an antagonist suggests that the cholinergic action on CSD, even in systemic pharmacological treatment, as studied previously, is based on mechanisms located in the brain tissue.

Key words: Pilocarpine; Scopolamine; Cortical Spreading Depression; Malnutrition; Physical exercise.

INTRODUCTION

The various neurological disorders and non-compliance with different nutritional conditions pose significant challenges to public health in many developing countries, leading to economic and sociocultural implications. It is believed that the modifications resulting from the combination of these conditions may intensify the harmful effects affecting the Central Nervous System (CNS) (PORTO et al., 2010). Given that both conditions are prevalent in our society, it is undeniable that we need to explore these situations further and understand their ramifications at behavioral, electrophysiological, biochemical, and cellular levels.

More studies with effective pharmacological agents in slowing neurodegenerative processes are needed. Conversely, numerous reports suggest that regular physical activity may also reduce the risk of neurological impairment in conditions such as multiple sclerosis, stroke, Parkinson's disease, and epilepsy (Cotman and Berchtold, 2002); (Eldar and Marincek, 2000); (Smith and Zigmond 2003); (Sosnoff et al, 2014). Research indicates that regular exercise can stimulate the growth of new neurons, a phenomenon known as neurogenesis, primarily in the hippocampus, a crucial region for memory (Van Praag et al, 1999); (Hillman et al, 2008)

Throughout life, many neurological changes begin to affect humans, such as epilepsy in the early decades of life, followed by strokes, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease, among others. A widely used model for studying epilepsy involves using the cholinergic agonist pilocarpine to induce epilepsy in rodents (Turski et al, Review, 1989 Pilocarpine, an alkaloid derived from Jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), exhibits muscarinic cholinergic agonist action. Intracerebral or systemic injection of this compound (at doses >300mg/kg) induces behavioral episodes of an epileptogenic nature, leading to a state of status epilepticus characterized by prolonged recurring seizures (Cavalheiro et al 1991). When administered at lower doses, Pilocarpine does not induce convulsions but can affect cerebral electrophysiological phenomena, such as Cortical Spreading Depression, the focus of our study. (Turski et al, 1984)

Cortical Spreading Depression (CSD) was originally described as a reduction ("depression") in brain electrical activity (both spontaneous and provoked) in response to electrical, mechanical, or chemical stimulation of a point on the brain surface. This response propagates as a reversible "wave" (all activity recovers after a few minutes) accompanied by the appearance of a "slow potential change" (SPC), characteristic of the phenomenon (LEÃO, 1944; LEÃO, 1947). This propagation occurs concentrically from the stimulated

point. In all vertebrates where CSD has been recorded, its propagation speed has been remarkably low (2 to 5 mm/min) compared to the magnitude of nerve impulse propagation in axons (up to tens of m/s). The low velocity of CSD has led some authors to postulate a humoral mechanism for the propagation of the phenomenon.

Based on previous studies, the present study analyzed the effect of topical application of cholinergic drugs (an agonist and an antagonist) at low concentrations on the cerebral cortex of exercised and sedentary rats. Therefore, this study aims to analyze the interaction between physical exercise and manipulation of the cholinergic system (through the application of an agonist and an antagonist) on the propagation of Cortical Spreading Depression (CSD) in well-nourished or early malnourished Wistar rats.

Materials and methods:

Animals:

Male albino Wistar rats (n=64 well-nourished and 25 malnourished) originating from the colony of our University were used. They were kept in collective cages at room temperature of $23\pm1^{\circ}\text{C}$ and a 12-hour light-dark cycle (light phase starting at 06:00 hours). They were fed ad libitum with standard balanced feed from the animal facility (with 23% protein) and filtered water. Neonates of both sexes, from various mothers, were grouped and randomly assigned to one of two distinct lactation conditions: 1) normal lactation, litters consisting of 9 pups, and 2) unfavorable lactation (Litters with 15 pups). It is known that this unfavorable lactation condition, due to the increase in litter size, promotes competition among the pups for maternal milk, leading to nutritional deficiency (Rocha-de-melo *et al* 2006); (Francisco and Guedes, 2015); (Lima *et al* 2017). Weaning was performed on the 21st day of postnatal life (PND), considering the day of birth as day zero. After weaning, the pups were fed the standard maternal diet.

Drugs

The drugs pilocarpine (cholinergic agonist) and Scopolamine (antagonist) were topically applied (in separate animals) to the parietal cortex during the CSD recording session. Topical application was performed in the cortical region between the two recording electrodes, as described below in the "Topical Treatment" section.

Treadmill exercise:

The animals in the exercised groups were subjected to treadmill running for five weeks using a motorized treadmill (Insight EP-131, 0° incline) from 28-30 days to 64-66 days of postnatal life. Training took place five days a week with thirty minutes of running per day, increasing speed according to the following schedule:

First. Week: Speed of 5 meters per minute.

Second week: Speed of 10 meters per minute.

Third to fifth week: Speed of 15 meters per minute, maintained until the end of the fifth week.

The animals in the sedentary group were also placed daily on the treadmill, but it remained turned off. The exercise and treatment conditions with Pilocarpine/Scopolamine are presented in Table 1.

Groups	Physical Condition	Drugs	Age of CSD recording	Traveled distance (m) per day
1	Exercised	Pilocarpine	64-66 days	1 st week = 150 m 2 nd week = 300 m 3 rd -5 th week = 450 m
2	Sedentary	Pilocarpine	64-66 days	Zero
3	Exercised	Scopolamine	64-66 days	Similar to group 1
4	Sedentary	Scopolamine	64-66 days	Zero

TABLE 1- Description of the four experimental groups, according to physical condition (exercised or sedentary) and topical treatment (Pilocarpine or Scopolamine).

Experimental groups:

The present study consisted of two experimental designs; the first design comprised eight groups of rats suckled under conditions of normal lactation, i.e., litters with nine pups (n

= 64). Four groups were subjected to the exercise condition ($n = 33$), and four were sedentary ($n = 31$). In these two conditions, two groups were topically treated with 5 mg/ml and 10 mg/ml of Pilocarpine solutions and two groups with 5 mg/ml and 10 mg/ml of Scopolamine.

The second experimental design consisted of four groups of malnourished rats during lactation, i.e., they were suckled under unfavorable lactation conditions in litters with 15 pups ($n = 25$). Figure 1 shows the distribution of animals in the 12 groups of this study.

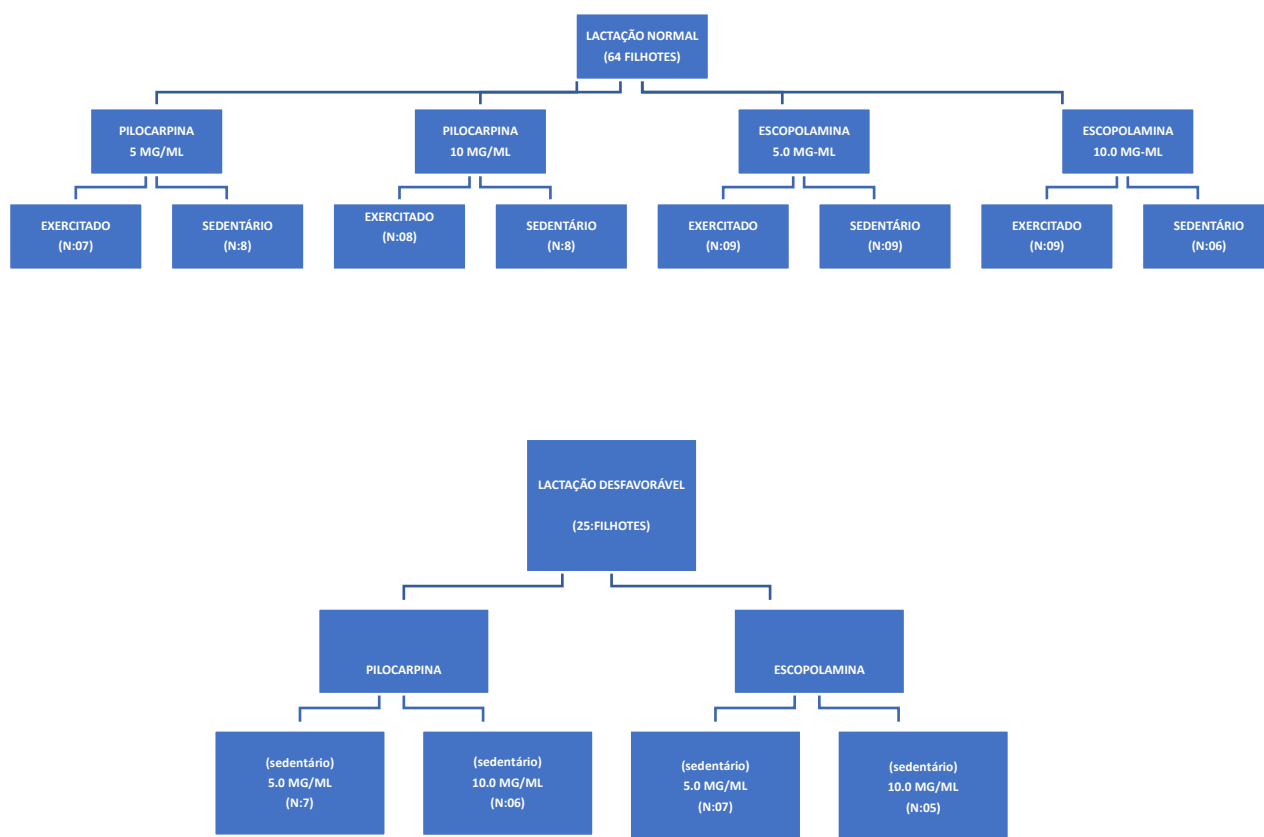


FIGURE 1. Schematic representation of the 12 groups of the two experimental designs.

Determination of body weight:

The animals' body weights were measured using a digital kitchen scale SF-400 (capacity up to 10.0 kg) on days 28, 35, 49, 55 and 60 of life and the day of electrophysiological recording.

CSD recording:

To obtain the electrophysiological recording, we anesthetized the animals (via intraperitoneal injection) with a solution containing 10% urethane + 0.4% chloralose at a ratio of 1 ml of solution per 100g of animal weight, corresponding to a dose of 1g/kg of urethane plus 40 mg/kg of chloralose. Subsequently, three holes were drilled on the right side of the skull, aligned in the anteroposterior direction, parallel to the midline, and spaced 4-6 mm apart. One hole was drilled in the frontal bone (2 mm in diameter) and was used to apply the chemical stimulus necessary to trigger CSD. In the other two holes in the parietal bone, two electrodes were placed to record its propagation (one electrode in each drilled hole, respectively referred to as recording points 1 and 2). Recordings were performed on a digital system (Biopac, USA Model MP150) and stored on a computer. In some experiments, the bone separation between the two recording holes was removed, joining the two holes into a single "eight-shaped" hole, thereby obtaining a larger area to be treated. Rectal temperature was monitored and maintained at $37\pm 1^\circ\text{C}$. CSD was triggered by chemical stimulation in the frontal hole, with a 20-minute interval between each stimulation; for this, a cotton pellet (1 to 2 mm in diameter) soaked in a 2% KCl solution was applied for 1 minute. Topical treatment with the pilocarpine agonist and scopolamine antagonist was administered during CSD recording. Figure 2 illustrates the setup used for CSD recording.

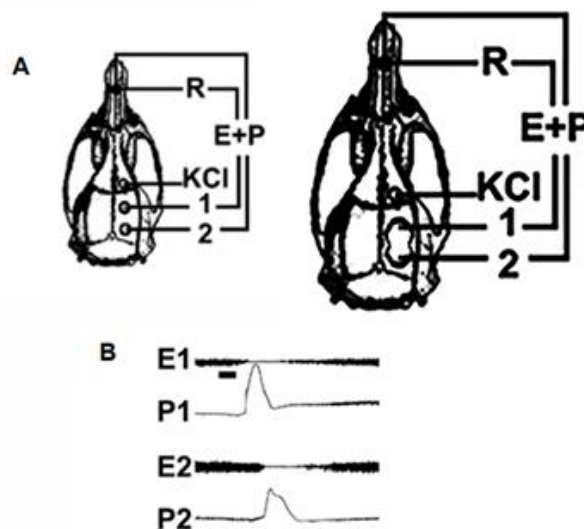


FIGURE 2: Scheme of the electrophysiological recording of CSD. In "A," on the left, a drawing of a rat skull with the identification of the three necessary holes for the experiment. The "KCl" hole corresponds to the stimulation site. At points "1" and "2," two electrodes were

positioned, one in each hole, in direct contact with the cortex, to measure the slow potential change (P) and the electrocorticogram concerning a reference electrode "R," located on the animal's nasal bone. In the skull drawing on the right, the two recording holes were merged to increase the area to be topically treated. In "B," four recording traces where the horizontal bar (below the first trace) represents 1 minute (referring to the presence of the stimulus, KCl). "E1" and "E2" correspond to the electrocorticographic recordings. "P1" and "P2" correspond to the VLV recording at points "1" and "2," respectively.

Cortical topical treatment:

The drugs were diluted in saline solution during the recording session and topically applied during the last 10 minutes of the 20-minute interval between successive stimulations with KCl, which was necessary to trigger CSD. Initially, a baseline recording was made for 80 minutes, during which no topical application was made, and four baseline CSD episodes were recorded. Then, in two distinct groups of rats, Pilocarpine and Scopolamine were applied in the final 10 minutes of the 20-minute interval between two consecutive CSD elicitations.

Three applications of each drug were performed, with 20-minute intervals between applications. At the end of each application, the treated cortical region was dried with dry cotton immediately before eliciting the next CSD episode.

After the last application, the treated cortical region was thoroughly washed with ringer's solution, and the CSD recording session continued for another 80 minutes (recovery period). In each animal, CSD parameters before and after topical treatment were compared. From the recorded data, the following CSD parameters were calculated: 1) the velocity of propagation of the phenomenon and 2) the amplitude and duration of its slow potential change (Silva *et al* 2017) ;(Lima *et al* 2017). The CSD propagation velocity was calculated based on the distance between the two recording electrodes and the time CSD took to traverse that distance. All information about the animal was recorded in an individual protocol.

Statistics:

The parameters of CSD (propagation velocity, amplitude, and duration) were calculated as described previously (Mendes-da-Silva, *et al* 2018). Intergroup comparisons were conducted using analysis of variance (ANOVA), accompanied by post hoc testing

(Holm-Sidak), when indicated. The propagation velocities of CSD, before and after topical application of the agonist (Pilocarpine) or antagonist (Scopolamine), were compared within the same animal using paired t-tests. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results

Body weight:

The average body weights are presented in FIGURE 3 below. As expected, the two nutritional conditions had a statistically significant weight difference. All animals were fed a standard diet from the vivarium during the post-lactation period. Weight reduction ranged from 10 to 30%, resulting from the impact of lactation condition.

Undernourished animals showed significant weight reduction at all ages compared to well-nourished animals of the same age ($p < 0.05$). There was no significant weight difference between sedentary and exercised animals under the same nutritional condition.

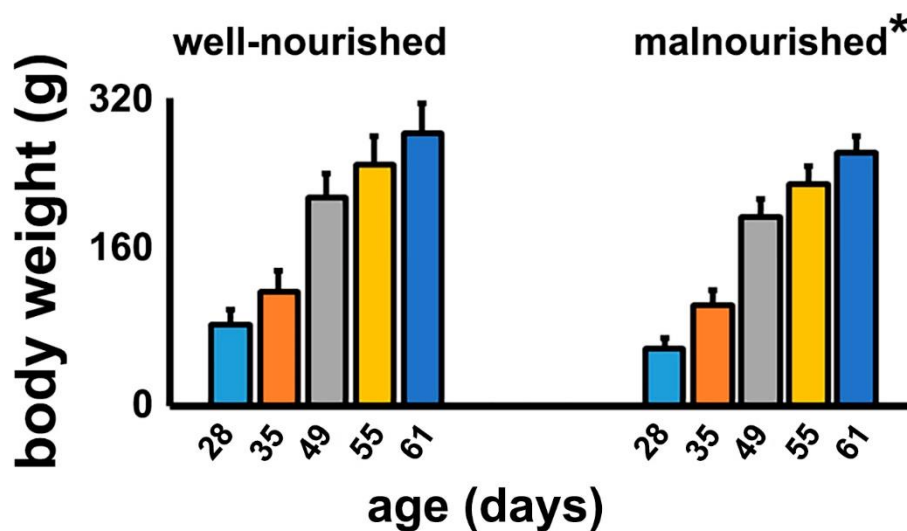


FIGURE 3- Body weight at 28, 35, 49, 55, and 61 days of age in well-nourished and malnourished animals during breastfeeding. After weaning, all received the same commercial diet. The * in the name of the malnourished group indicates that at all ages, the malnourished weighed significantly less than the well-nourished ($p < 0.05$). There was no significant weight difference between sedentary and exercised individuals.

CSD parameters:

As a general rule, stimulation for 1 minute with 2% KCl at a point on the frontal cortex generated a single wave of CSD that propagated continuously and was recorded by the two electrodes located posteriorly on the surface of the parietal cortex (see the stimulation point and the two recording points in the skull diagram of **figure 4**). At each recording point, the slow potential change confirmed the presence of CSD after the KCl application. The electrophysiological changes caused by CSD always recovered after a few minutes (**Figure 4**), and we maintained a 20-minute interval between subsequent KCl stimuli.

Compared to the sedentary condition, physical exercise (treadmill running) reduced the propagation velocity of CSD, confirming previous studies (Batista-de-oliveira *et al*, 2012); (Lima *et al* 2014). Regarding amplitude, there was a reduction after pilocarpine application in both concentrations, even in the presence of physical activity. Concerning duration, in both concentrations, there was an increase after drug application, with this effect being more pronounced under exercise conditions. Along with literature data (Lima *et al* 2014), this finding suggests a neuroprotective effect of treadmill exercise.

Effect of topical cortical application of Pilocarpine:

The topical application of Pilocarpine reduced the propagation velocity of CSD at 10 mg/ml but not at the lower concentration (5 mg/ml). The results in well-nourished animals are presented in FIGURES 4 and 5. These data allow us to state that the decelerating effect of Pilocarpine was concentration-dependent on the topically applied solutions.

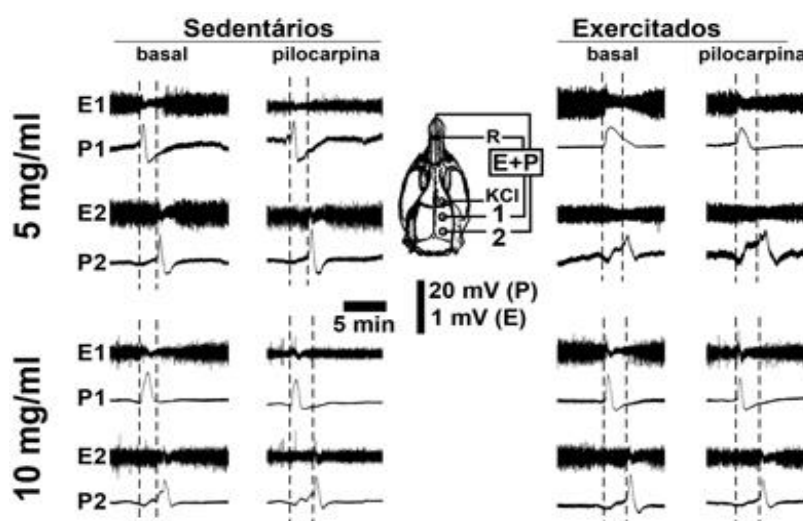


FIGURE 4- Records of electrocorticogram (E) and slow potential change (P) typical of cortical spreading depression (CSD) in sedentary and exercised well-nourished rats before (baseline) and after topical treatment with 5 and 10 mg/ml of Pilocarpine. The skull diagram in the center of the figure indicates R (reference electrode); holes 1 and 2 correspond to the recording and topical treatment points with Pilocarpine; KCl, Hole for stimulation application for 1 minute to trigger CSD. The dashed vertical lines indicate the latency (time taken by CSD to propagate from point 1 to point 2). Note the increase in latency after application of the higher concentration of Pilocarpine.

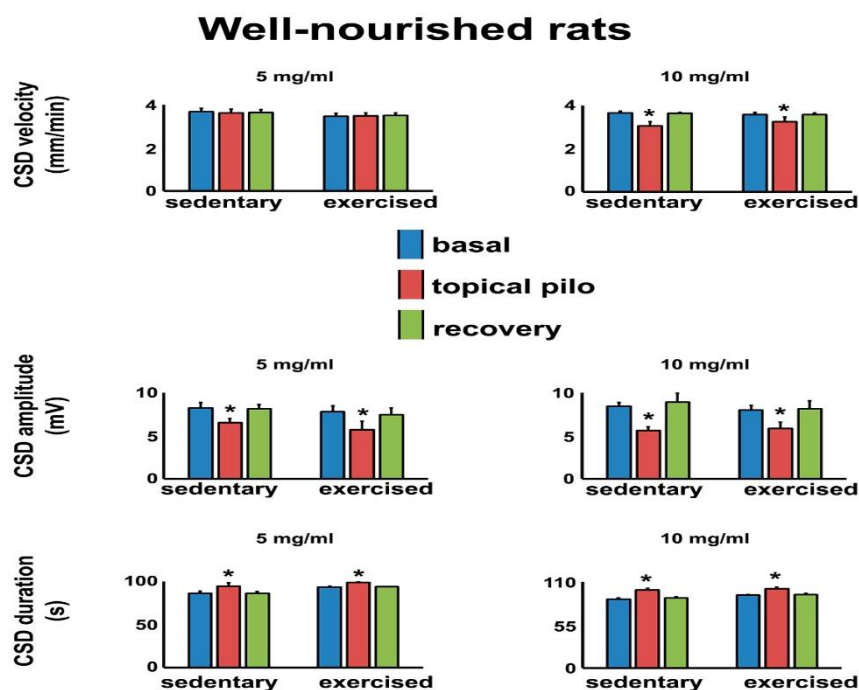


FIGURE 5: Electrophysiological variables (Propagation velocity, Amplitude, and Duration) of cortical spreading depression (CSD) in well-nourished sedentary and exercised rats who received topical application of Pilocarpine in two concentrations (5.0 and 10.0 mg/ml) during the CSD recording session. The bars indicate the control or baseline period (blue), followed by Pilocarpine application (red) and, subsequently, the recovery period (green). Data are means $\pm$ standard deviations. * = $p < 0.05$ compared to the previous and subsequent values of the same animal (paired t -test).

In undernourished animals, the topical application of a solution with 5 mg/ml of Pilocarpine (**FIGURE 6**) did not significantly affect the analyzed variables, such as Propagation velocity, amplitude, and duration of CSD (Figure 6, upper panels).

In the group treated with a concentration of 10 mg/ml of Pilocarpine, a significant decrease in velocity and amplitude and a significant increase in duration of CSD were observed when comparing the treatment/recovery periods with the drug application period (Figure 6, lower panels).

Finally, it was observed that compared to well-nourished animals, the velocity of CSD is higher in undernourished ones and that the drug response is more pronounced at higher concentrations.

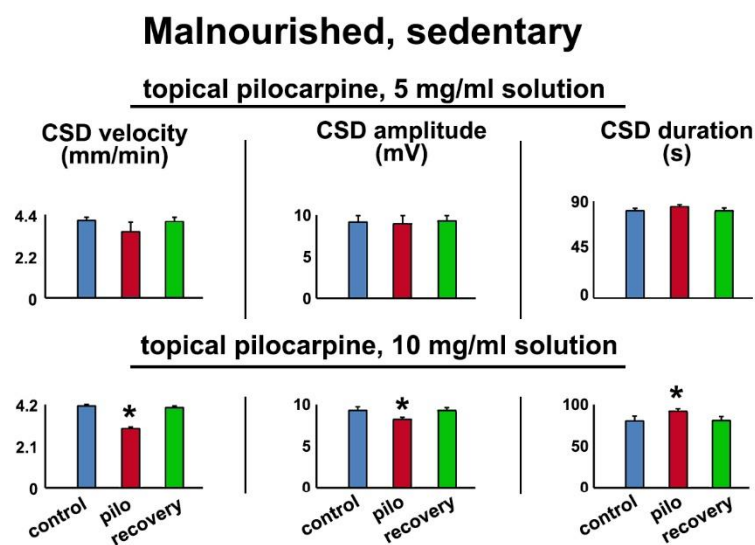


Figure 6: Effect of Pilocarpine treatment in undernourished and sedentary rats who received topical application of Pilocarpine at concentrations of 5.0 and 10.0 mg/ml. The bars indicate the control or baseline period (blue), followed by Pilocarpine application (red) and, subsequently, the recovery period (green). Data are means $\pm$ standard deviations. * = $p < 0.05$ compared to the baseline and recovery values of the same animal (paired t -test).

Effect of topical cortical application of Scopolamine:

Contrary to Pilocarpine, topical application of Scopolamine in well-nourished rats significantly increased CSD's propagation velocity and amplitude. It decreased its duration at 5 and 10 mg/ml concentrations under sedentary and exercised conditions. In other words, the velocity and amplitude increase with scopolamine application, regardless of the physical activity criterion. The results are presented in Figure 7.

As in all recordings (see methods), the slow potential variation confirmed the presence of CSD after the KCl application. The electrophysiological changes caused by CSD always recovered after a few minutes, and we maintained a 20-minute interval between consecutive KCl stimuli.

It was concluded that Scopolamine increases the velocity and amplitude of CSD and decreases its duration. In conclusion, we can confirm that, in the evaluated variables, the reversibility of the phenomenon is observed, regardless of the physical condition. It was observed that at the concentration of 5.0 mg/ml, the drug's action is already evident. It differs in response from the topical application of Pilocarpine at this same concentration; compare Figure 5 with Figure 7.

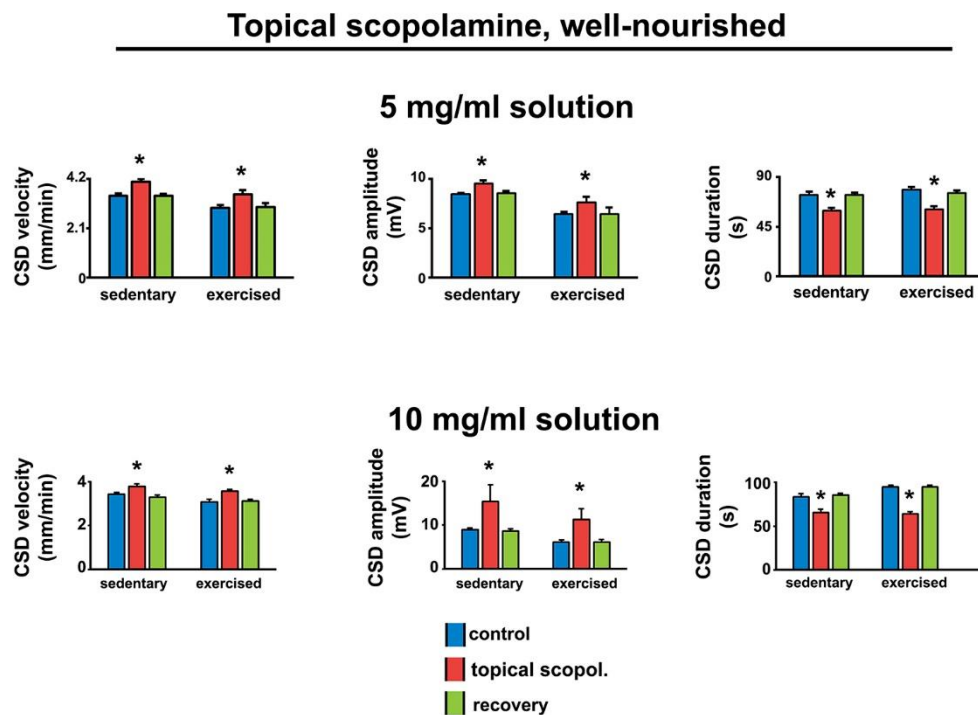


FIGURE 7: Effect of topical application of Scopolamine at 5.0 and 10 mg/ml concentrations in well-nourished sedentary and exercised rats. The colored bars indicate the mean values $\pm$ standard deviations in the baseline period (blue bar), followed by the mean value after scopolamine application (red bar), and subsequently in the recovery period, after cessation of topical drug application (green bar). * = $p < 0.05$ compared to the previous and subsequent values of the same animal (paired t -test).

It has been confirmed that physical exercise has a neuroprotective effect; that is, it protects the brain against CSD, making it more resistant to its spread, judging by the reduction in its propagation speed in the exercised group compared to the sedentary group. The drug's effect on CSD is always reversible, regardless of its concentration.

In the malnourished group, topical treatment with solutions containing 5 mg/ml and 10 mg/ml of Scopolamine showed different effects: there was a significant acceleration of CSD, as well as an increase in its amplitude and a reduction in its duration, only at the concentration of 10 mg/ml, as illustrated in FIGURE 8

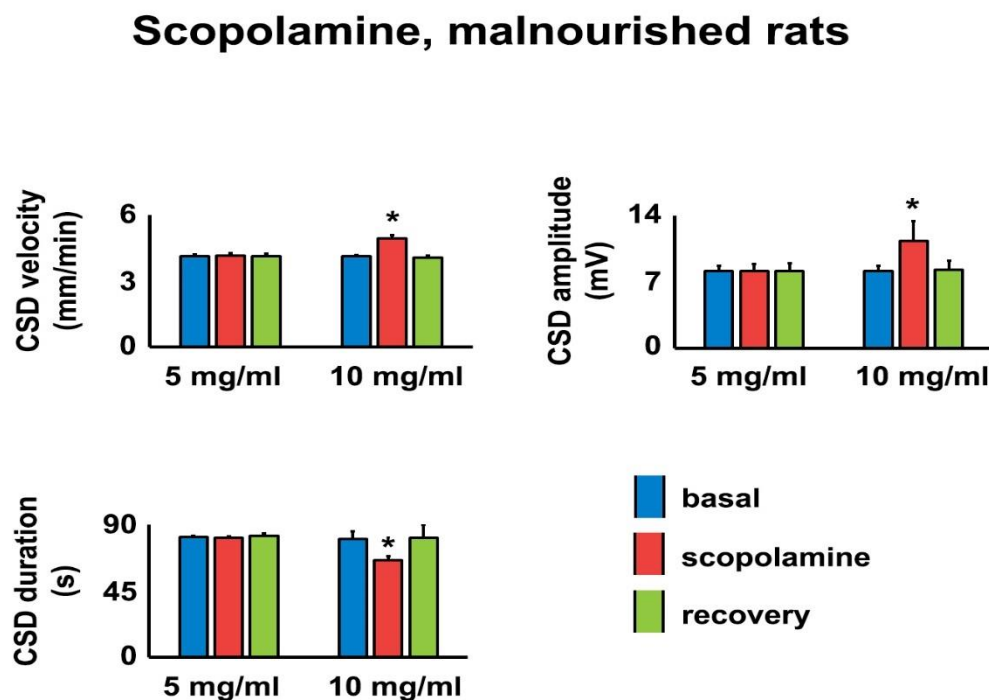


FIGURE 8: Effect of Topical Treatment with Scopolamine on Sedentary Malnourished Rats Who Received Scopolamine at 5.0 and 10.0 mg/ml Concentrations. The colored bars indicate the control period, or baseline (blue bar), followed by the period immediately after the application of Scopolamine (red bar) and subsequently the recovery period after cessation of drug application (green bar). Data are means $\pm$ standard deviations. * = $p < 0.05$ compared to baseline and recovery values of the same animal (paired t -test).

Regarding the variables of CSD analyzed here, there was an increase in propagation velocity and amplitude of the negative component of slow potential change only in the group treated with the concentration of 10 mg/ml. As for duration, a decrease was observed in the group that received the previously mentioned concentration.

No significant effect was seen with topical application of Scopolamine at the concentration of 5 mg/ml (Figure 6). This lack of effect observed in the 5mg/ml malnourished group suggests that early malnutrition (during breastfeeding) reduces the action of cholinergic agents on the biochemical mechanisms implicated in the impairment of the CSD phenomenon. Further experimental investigation is needed to confirm this attenuating effect of early malnutrition on the action of Pilocarpine and Scopolamine on cortical susceptibility to CSD.

DISCUSSION

Our data show that the nutritional condition during the lactation period (which in the present study was altered by an increase in litter size) can induce weight and electrophysiological differences, even if, after weaning, the animals are fed the standard diet of the vivarium, with a normal level (23%) of protein. These data corroborate previous findings, as indicated in (Batista-de-oliveira *et al* 2012); (Francisco and guedes 2015); (Lima *et al* 2009); (Rocha-de-melo *et al* 2006).

Previous studies by our group have shown that malnutrition can be caused by an imbalanced or deficient diet in nutrients necessary for maintaining organismal health, with a common lack of antioxidant factors in this clinical condition (Mendes-da-silva *et al* 2018; (Morgane *et al* 1978). Our weight evolution data confirm this finding, as unfavorable lactation leads to a decrease in nutrients necessary for organism development in early life, resulting in decreased body weight persisting into adulthood (Figure 3).

Every day, research into the effects of physical exercise on the human body grows concerning its effects on physiological, psychosocial, and behavioral parameters. Although some authors report that physical exercise leads to weight reduction in rats (Lima *et al* 2014); The data from this study regarding the evolution of body weight show that there was no statistically significant weight difference between exercised and sedentary animals, indicating that under the conditions of animal age and intensity and duration of physical exercise, it did not bring about significant changes concerning well-nourished animals.

Our results show that nutritional deficiency was consistently associated with increased propagation velocity and amplitude of CSD and with a reduction in the duration of the phenomenon. This association between malnutrition and increased cortical sensitivity to CSD confirms previous observations from our laboratory (Guedes *et al* 1987); (Andrade *et al* 1990; (Rocha-de-melo and Guedes, 1997); (Rocha-de-melo *et al*, 2006).

The interaction between nutritional status and cholinergic agents is complex and multifaceted. Studies have shown that adequate nutrition plays a crucial role in the effectiveness of treatment with these agents. For example, deficiencies in certain nutrients, such as choline and folic acid, can compromise the synthesis and release of acetylcholine (the principal neurotransmitter of the parasympathetic system, known for its cholinergic activity), thereby reducing the response to cholinergic mediators.

Furthermore, consuming certain foods may interfere with the absorption or metabolism of these drugs, affecting their therapeutic efficacy. A survey study in humans have demonstrated that the practice of eating can influence cognitive performance (Otsuka 2022).

In this context, an important aspect of our study is the evaluation of the effectiveness of cholinergic drugs in modifying the electrophysiological variables of CSD. Our study showed that the higher the concentration of the cholinergic agonist Pilocarpine, the better its response in terms of velocity, amplitude, and duration (Figures 3 and 4) in well-nourished and malnourished animals. However, the effect of Pilocarpine is less evident in animals with greater nutritional deficiency, where significant effects are only observed at the concentration of 10 mg/ml. These data align with the study by Francisco *et al* 2019.

Pilocarpine, when applied in small doses, does not induce seizures, but it can exert harmful effects on the brain. Previous studies have pointed out the effects on the nervous system of subconvulsive doses of Pilocarpine administered systemically (Duarte *et al* 2013); (Guedes and Vasconcelos, 2008); (Vasconcelos *et al* 2004) ;(Francisco *et al* 2019); (Benevides *et al* 2020). These studies are important for demonstrating the deleterious action of this drug on the brain in the absence of seizures. The behavioral and electrographic modifications that occur in the pilocarpine model (Guedes and Cavalheiro, 1997) are similar to those that occur in human temporal lobe epilepsy (TLE) (Turski *et al* 1989). In experimental models, Pilocarpine administered systemically in low concentrations (subconvulsive) for 21 days is capable of reducing the propagation velocity of CSD, a result that can be analyzed by the appearance of slow potential change, typical of CSD (Francisco *et al* 2019).

As for the action of the cholinergic antagonist Scopolamine, our data indicate that at the lower concentration used (5 mg/ml), the effects on CSD are visible in the well-nourished group (Figure 4) but not in the malnourished group (Figure 6). Our data also demonstrate that physical exercise can modulate the effect of the cholinergic antagonist pilocarpine on CSD but does not prevent this effect, even though physical exercise is neuroprotective concerning

CSD. This finding requires further studies to clarify its mechanisms. Studies on the interaction between cholinergic antagonists and physical exercise are scarce, especially when these drugs are applied topically. Although clinically less relevant in humans, the topical application of drugs has the advantage of circumventing (avoiding) general systemic side effects. In our case, Pilocarpine and Scopolamine were applied directly to the intact dura mater on the cortical surface. The evident observation of these drugs' effects on CSD propagation demonstrates processes based on cortical brain tissue that would be involved in the cholinergic effects observed in this study.

Cortical spreading depression (CSD) is a phenomenon that allows us to analyze these parameters. Experimentally, other authors have suggested that exercise slows down the propagation of CSD and modulates microglial reactions in the cerebral cortex (LIMA *et al.*, 2014). In the present project, the data confirm that exercise reduced the propagation velocity of CSD compared to sedentary animals, suggesting a neuroprotective effect of physical exercise on the nervous system. Our results agree with Vitor-de-lima *et al* (2018) study, which employed the same treadmill exercise methodology. Recently, in addition to treadmill exercise, a similar effect (slowing of CSD) was demonstrated in rats subjected to voluntary physical exercise on activity wheels (Vitor-de-lima *et al* 2023). This finding suggests that the effect of exercise on CSD is independent of the type of exercise.

Other studies also show the action of Pilocarpine associated with treadmill exercise and present exercise as an inhibitor and protector against the action of this drug Lim *et al* (2015). These authors subjected animals (rats) to physical exercise for a shorter duration (2 weeks) than in the present study (3 weeks). They found a lesser GABAergic neuronal loss than the sedentary group, even in epileptic animals by Pilocarpine. In discussing possible mechanisms, these authors postulate the involvement of negative regulation of the BDNF-TrkB signaling pathway (Lim *et al* 2015).

7. CONCLUSION

In conclusion, the results of this study suggest a cerebral effect of physical activity in rats treated with Pilocarpine and Scopolamine, which are expressed in the electrophysiological variables related to CSD and nutritional alterations. The pharmacological modulation of cerebral cholinergic activity is inversely associated with CSD propagation. Physical exercise, considered neuroprotective, did not prevent but modulated the action of Pilocarpine and Scopolamine. The efficacy of topical application of the cholinergic agonist

pilocarpine and the antagonist scopolamine suggests that cholinergic action on CSD is based on mechanisms localized in the brain tissue. Even in systemic pharmacological treatment with Pilocarpine, as previously studied (Guedes and Cavaleiro, 1997), the CSD effects depend upon brain receptors and not on the systemic drug metabolism's indirect or secondary effect. For some of these parameters, the data suggest an interaction between drugs and physical activity and malnutrition, the mechanisms of which deserve further exploration.

REFERENCES

- Andrade AFD; Guedes RCA; Teodósio NR (1990). Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 23:889-893.
- Batista-de-Oliveira M; Lopes AAC; Mendes-da-Silva RF; Guedes RCA (2012) Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Exp. Gerontol.**, 47: 452-457.
- Benevides RDL, Vitor de-Lima SM, Chagas CL, Lima CF, Abadie-Guedes R, Guedes RCA. (2020). Lactation in large litters influences anxiety, memory, and spreading depression in adult male rats that were chronically subjected to a non-convulsive pilocarpine dose. **Nutritional Neuroscience** 22:1-12. DOI 10.1080/1028415X.2020.1819103.
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991; 32(6):778-82. doi: 10.1111/j.1528-1157.1991.tb05533.x.
- Cotman CW; Berchtold NC (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends neurosci.** 25:295-301
- Duarte FS; Duzzioni M; Hoeller AA; Silva NM; Ern AL; Piermartiri TC; Tasca CI; Gavioli EC; Lemos T; Carobrez AP; Lima TCM (2013). Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: An animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology** 227: 209–219.
- Eldar R; Marincek C (2000). Physical activity for elderly persons with neurological impairment: a review, scand. **J. Rehabil. Med.** 32: 99-103
- Francisco ES; Mendes-da-Silva RF; Castro CBL; Soares GSF; Guedes RCA (2019). Taurine/Pilocarpine Interaction in the Malnourished Rat Brain: A Behavioral, Electrophysiological, and Immunohistochemical Analysis. **Front Neurosci.** 2019; 13:981. doi: 10.3389/fnins.2019.00981.
- Francisco ES; Guedes RCA (2015). Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, 47: 2437–2445, 2015.
- Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nat Rev Neurosci.** 2008 Jul;9(7):568-78. doi: 10.1038/nrn2421. PMID: 18568016; PMCID: PMC2805706
- Guedes RCA; Andrade AFD; Cabral-Filho JE (1987). Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 20: 639–642.
- Guedes RCA; Cavalheiro, EA (1997). Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Res.** 27:33-40.

- Guedes RCA; Vasconcelos CAC (2008). Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neurosci. Lett.** 442: 118–122.
- Hillman CH; Erickson KI; Kramer AF (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nature Rev. Neurosci.** 9:58-65.
- Leão AAP (1944a). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7: 359-390.
- Leão AAP (1944b). Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7: 391-396.
- Lim BV, Shin MS, Lee JM, Seo JH (2015). Treadmill exercise prevents GABAergic neuronal loss with suppression of neuronal activation in the pilocarpine induced epileptic rats. **J Exerc Rehabil.** 11:80–86.
- Lima CB; Soares GS; Vitor SM; Castellano B; Andrade-da-Costa BL; Guedes RCA (2014). Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **Int. J. Devel. Neurosci.** 33:98–105.
- Lima DSC; Francisco ES; Lima CB; Guedes RCA (2017). Neonatal L-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size-and large size litters. **Amino Acids**, 49: 337-346, 2017.
- Mendes-da-Silva RF; Francisco ES, Guedes RCA (2018). Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: Electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. **Brain Res Bull.** 2018; 142:414-421. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.09.008.
- Morgane PJ; Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz E, Resnick O (1978). The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 2:137- 230.
- Otsuka R (2022). Diet, nutrition, and cognitive function: A narrative review of Japanese longitudinal studies. *Geriatr Gerontol Int* 2022; 22: 825–831. DOI: 10.1111/ggi.14463
- Porto JA; Oliveira AG; Largura A; Adam TS; Nunes ML (2010). Effects of epilepsy and malnutrition in the developing central nervous system: clinical aspects and experimental evidences. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 16:26-31. DOI: 10.1590/S1676-26492010000100006
- Rocha-de-Melo AP; Guedes RCA (1997). Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 30: 663–669 1997.

- Rocha-de-Melo AP; Cavalcanti, JB, Barros, AS, Guedes, RCA (2006). Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutr. Neurosci.** 9:155-160.
- Silva-Gondim MB; Souza TKM; Rodrigues MCA; Guedes RCA (2017). Suckling in litters with different sizes, and early and late swimming exercise differentially modulates anxiety-like behavior, memory and electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats. **Nutritional Neuroscience**, 29: 1-10, 2017.
- Smith AD; Zigmond MJ (2003). Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism, **Exp. Neurol.**, 184: 31-39.
- Sosnoff JJ; Finlayson M; Mcauley E; Morrison S; Motl RW (2014). Home-based exercise program and fall-risk reduction in older adults with multiple sclerosis: phase 1 randomized controlled trial. **Clin Rehabil.** 28:254-63. Doi: 10.1177/0269215513501092. (2014)
- Turski L; C Ikonomidou, WA Turski, ZA Bortolotto, EA Cavaleiro (1989). Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse** 3:154–171.
- Turski, Waldemar A. et al. Convulsões produzidas pela pilocarpina em camundongos: análise comportamental, eletroencefalográfica e morfológica. **Pesquisa cerebral** , v. 321, n. 2, pág. 237-253, 1984.
- Vitor-de-Lima SM; Medeiros LB; Benevides RDL; Santos CN; Lima-da-Silva NO; Guedes RCA (2017). Monosodium glutamate and treadmill exercise: Anxiety-like behavior and spreading depression features in young adult rats. **Nutritional Neuroscience** 20:1-9, DOI 10.1080/1028415X.2017.1398301
- Vitor-de-Lima SM; Figueira-de-Oliveira ML; Tavares IS; Leandro CVG; Guedes RCA (2023). 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** 26: 1-12 DOI: 10.1080/1028415X.2023.2166415
- Van Praag H; Christie BR; Sejnowski TJ; Gage FH (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA** 96:13427-31. DOI:10.1073/pnas.96.23.13427
- Vasconcelos CAC; Oliveira JAF; Costa LAO; Guedes RCA (2004). Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutritional Neuroscience** 7:163-170.

ANEXOS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 30 de agosto de 2022

Ofício nº 62/22

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

Para: Prof. **Rubem Carlos Araújo Guedes**

Departamento de Nutrição/CCS

Processo nº 0044/2022

Certificamos que a proposta intitulada "**Interação exercício físico/sistema colinérgico: análise eletrofisiológica em ratos submetidos ao tratamento tópico com agonista e antagonista colinérgico.**" Registrado com o nº0044/2022 sob a responsabilidade de **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes** o que 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 30/08/2022

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2022 a 01/08/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus albinus</i> (linhagem wistar,) Rato Heterogênico
Nº de animais	48 animais
Peso/Idade	60-250g/ 28-70 dias
Sexo	Machos (48)
Origem: Biotério de Criação	Biotério Colônia de criação do Departamento de Nutrição UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério Colônia de criação do Departamento de Nutrição/UFPE

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

I) **ARTIGO: Dear Prof. Guedes,**

Thank you for submitting your manuscript,
"Effects of topical cortical application of a cholinergic agonist and an antagonist on the propagation of cortical spreading depression: modulation by exercise and malnutrition", to Experimental Brain Research.

The submission id is: EXBR-D-24-00148

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the Journal's website.

Your username is: Rubem Araújo Guedes

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/exbr/>.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Experimental Brain Research.

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, Catarina Nicacio Dos.

Interação exercício físico/sistema colinérgico: análise eletrofisiológica em ratos em diferentes condições nutricionais submetidos ao tratamento tópico cortical com agonista e antagonista colinérgico / Catarina Nicacio Dos Santos. - Recife, 2024.

56f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2024.

Orientação: Rubem Carlos Araújo Guedes.

1. Aplicação tópica cortical; 2. Escopolamina; 3. Desnutrição; 4. Pilocarpina; 5. Depressão alastrante; 6. Exercício físico. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central