

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO EXERCÍCIO FÍSICO, ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum.L*), NA PLASTICIDADE DE CÉLULAS HIPOCAMPAIS DE RATOS WISTAR

Karina Maia Paiva¹ Rodrigo Freire de Oliveira¹ Paulo Leonardo Araujo de Gois Moraes² José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti³

1. Aluno (a) bolsista CAPES de doutorado pelo Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)
2. Professor em Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) – Faculdade de Ciências da Saúde
3. Professor em Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) – Faculdade de Ciências da Saúde/ orientador

Resumo

O presente trabalho se dispôs a avaliar o efeito do exercício físico, associado a suplementação com óleo de linhaça no hipocampo de ratos. Todos os procedimentos foram conduzidos sob licença da Comissão de Ética em Experimentação Animal. Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar, machos, dispostos em quatro grupos experimentais, com animais submetidos ao nado e/ou suplementação. O nado consistiu em um protocolo progressivo de 28 dias, seguido de perfusão dos encéfalos, microtomia, imunohistoquímica para GFAP, análise morfométrica e análise estatística. O exercício físico associado a uma suplementação com óleo de linhaça demonstrou ser capaz de alterar a plasticidade de astrócitos GFAP (+) quanto a expressão de GFAP nas células gliais nas regiões CA1, CA3 e Giro Denteado do hipocampo.

Autorização legal: Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), com número de parecer 001/17.

Palavras-chave: Neuroplasticidade; GFAP; Nado.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Introdução

Há tempos, tem sido demonstrada uma relação positiva entre a prática de exercícios físicos e sua influência no metabolismo do Sistema Nervoso Central (SNC) (HILMAN; ERICKSON; KRAMER, 2008), onde o esforço físico eleva a síntese de neurotransmissores além de promover a neuroplasticidade (MCMORRIS et al., 2011). Atividade física é definida por qualquer movimento corporal produzido por contração muscular que cause gasto energético (HOWLEY, 2001). Quando realizado regularmente, sua definição muda para exercício físico, pois o organismo adapta-se a este estímulo através de alterações morfofuncionais que resultam em um maior desempenho físico e inúmeros benefícios à saúde (SILVA, 2010). Desta maneira, essa prática é capaz de ativar cascatas celulares e moleculares que induzem e mantêm a plasticidade neuronal, permitindo a expressão de genes associados à plasticidade, promovendo sinaptogênese e neurogênese no hipocampo, aumentando a vascularização, o metabolismo cerebral e diminuindo a ansiedade (GOURGOUVELIS; YIELDER; MURPHY, 2017).

A linhaça (*Linum usitatissimum.L*) é conhecida como um alimento funcional, sendo bastante rica em ácidos graxos ômega 3 e possui diversos nutrientes, fibras e compostos antioxidantes (MAYES, 1994). O óleo obtido da planta, atua nos processos cognitivos, aumentando a plasticidade das células neuronais do hipocampo, por exemplo, e reduzindo os danos oxidativos ocasionados por radicais livres no encéfalo (SARSILMAZ et al., 2003).

Diversas doenças neurodegenerativas são ocasionadas pela disfunção de células neuronais, podendo provocar a degeneração progressiva e morte celular de neurônios no sistema nervoso, causando a destruição dos tecidos, que podem levar a perdas cognitivas e motoras, como observadas nas doenças de Alzheimer e Parkinson. A prática de exercício físico regular e a suplementação alimentar com substâncias antioxidantes vem demonstrado ação efetiva sob o sistema nervoso central, propiciando benefícios na cognição

do indivíduo, no aspecto morfofisiológico, melhora nos processos de aprendizagem e memória, prevenção de demências, no desenvolvimento de novas sinapses e na neurogênese de células neuronais. Dessa forma, apresenta-se a importância de se avaliar o efeito neuroplástico do exercício físico de forma regular no sistema nervoso, assim como a administração concomitante de substâncias antioxidantes como óleo de linhaça sob a capacidade de recuperação dessas células a fim de esclarecer mecanismos responsáveis pela plasticidade celular no sistema nervoso.

Dessa forma, os objetivos do trabalho se consagram em analisar o efeito do exercício físico, associado a suplementação com óleo de linhaça (*Linum usitatissimum.L*), no hipocampo de Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) comparando, mediante contagem das células imunorreativas para GFAP os efeitos do exercício e suplementação.

Metodologia

Foram utilizados 24 (n=6) *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, 3 meses, 250-350g, dispostos aleatoriamente em quatro grupos de estudo: 1) grupo controle sedentário (sem suplementação); 2) grupo submetido a suplementação com óleo de linhaça; 3) grupo submetido a suplementação com óleo de linhaça + exercício; 4) grupo submetido apenas ao exercício. O plano de treinamento de nado consistiu em 28 dias, dividido em quatro fases, de sete dias consecutivos cada de forma progressiva. A primeira fase consistiu em ciclos progressivos 3 a 6 ciclos durante a primeira semana. Na segunda fase, um peso de chumbo correspondente a 2,5% a 5% do peso corporal foi atado ao animal. Os testes ocorreram em frascos bojudos plásticos (60 cm) preenchidos com água, em temperatura média de 30°C, pelo turno vespertino. Ao fim de cada experimento, os roedores foram secos e devolvidos à gaiola. O óleo de linhaça 500mg/kg (1%v/c) utilizado foi administrado concomitante ao nado, por meio de gavagem oral, com um intervalo de 30 minutos. Utilizou-se como veículo de diluição para o óleo de linhaça, água destilada com adição de gotas de tween 80.

Após os procedimentos de rotina os animais foram submetidos à anestesia, onde foram administradas por via intramuscular cetamina (90mg/kg) e xilazina (15mg/kg). Após o efeito anestésico detectado, ocorreram as perfusões posicionando uma cânula dentro da aorta ascendente, conectada a uma bomba peristáltica. Após a incisão no átrio direito, foram infundidos 200 mL de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina durante aproximadamente seis minutos. A seguir, administrou-se 450 ml de solução fixadora composta por paraformaldeído 4%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4.

Os cortes obtidos após a perfusão dos encéfalos foram submetidos a imuno-histoquímica para GFAP. Onde foram incubados em anticorpo primário contra o anticorpo monoclonal anti-GFAP (Sigma, 1:500) por 12 horas. Ao fim deste período, os cortes passaram por lavagens em tampão fosfato, em agitador orbital e em seguida colocados em contato com o anticorpo secundário anti-camundongo obtido em asno (Jackson) diluído a 1:1000 no mesmo veículo anterior, por 120 minutos. Após mais lavagens, foram colocados na solução do complexo avidina-biotina-HRP, numa diluição de 1:100 em Triton X-100 a 0,4%, contendo NaCl, por 120 minutos. Para visualização da reação, as seções foram postas em meio contendo H₂O₂ como substrato e a DAB. Os cortes foram montados em lâminas silanizadas, que após secas foram imersas em solução de tetróxido de ósmio a 0,05%. Após as etapas de desidratação, em baterias de álcool, as lamínulas foram montadas sobre os cortes com o uso de DPX. Os cortes foram examinados utilizando um microscópio óptico em campo claro e utilizando o programa ImageJ foi realizada a aferição da área e perímetro para verificar possíveis mudanças morfométricas. Para confirmação estatística foi utilizado teste Kruskal-Wallis e correlações pelo pós-teste de Dunn.

.Resultados e Discussão

Nesse estudo, foi realizada a imunohistoquímica para GFAP a fim de avaliar a plasticidade de astrócitos no hipocampo sob uma avaliação do marcador nas células. Também foi realizada análise estatística para avaliação dos parâmetros morfométricos de área e perímetro celular entre os grupos de animais submetidos a um exercício físico de nado e suplementação dietética com óleo de linhaça. Foram consideradas para análise as regiões de maior impacto funcional do hipocampo, onde se encontram os circuitos sinápticos principais que se relacionam à plasticidade celular, as regiões CA3, CA1 e Giro Denteado. A análise morfológica qualitativa das regiões mediais CA1, CA3 e Giro Denteado no hipocampo demonstrou um aumento na reatividade da proteína GFAP aos astrócitos dos grupos de animais submetidos à suplementação com óleo de linhaça, com e sem exercício físico em relação ao controle negativo, principalmente no grupo OLEX (exercício + suplementação), demonstrando um possível efeito plástico das células gliais no hipocampo nesses animais. Quanto à análise morfométrica da plasticidade astrocítica do grupo OLSE (sedentários + exercício) foi demonstrado o efeito plástico relacionado ao aumento de área e perímetro dos astrócitos nas regiões do CA1, CA3 e Giro Denteado em relação ao controle negativo, porém efeito plástico inferior quando comparado ao grupo de exercício e suplementação avaliando a área de CA1. Dentre os aspectos neuroquímicos, a análise da expressão de GFAP por imunoreatividade, demonstrou efeito plástico do grupo de animais submetidos ao exercício físico de nado por 28 dias e suplementados com óleo de linhaça (OLEX) relacionado ao aumento de área e perímetro dos astrócitos marcados em relação ao controle negativo nas regiões de CA1, CA3 e Giro Denteado.

Atividades fisiológicas como o exercício físico já demonstraram regular a neurogênese hipocampal por meio da maturação celular, proliferação, integração de circuitos sinápticos, aumentando significativamente o LTP (potencial de longa duração), fornecendo aporte de oxigênio e glicose ao cérebro por meio do aumento de fluxo sanguíneo cerebral e otimizando o quadro clínico de ansiedade (ZWAMBORN et al., 2018). O grupo de animais

submetidos ao exercício físico (OLEX) demonstrou alterar morfológicamente os astrócitos hipocâmpais positivos para GFAP nas regiões CA1, CA3 e giro denteado. Esse resultado corrobora com estudos anteriores que utilizaram GFAP como marcador de alterações morfológicas geradas pelo exercício em diferentes regiões do hipocampo (SAUR et al., 2014; COBB et al., 2016; KUMAR et al., 2018). A expressão de GFAP nas células neurais são reguladas a partir de mecanismos epigenéticos, onde durante a formação dos astrócitos, a desmetilação do gene GFAP medeia a ativação da transcrição genética que expressa essa molécula (KUMAR et al., 2018).

As diferenças nos padrões de reatividade à proteína GFAP entre os grupos OLSE, OLEX, Controle Positivo e Controle Negativo, demonstra a influência direta do exercício físico à plasticidade de células gliais no hipocampo quanto à sua área e perímetro. O aumento das ramificações morfométricas dos astrócitos possivelmente promove uma maior influência sob a sinapse neural, reforçando o processamento cognitivo e consolidação de memória no hipocampo (SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013). O aumento da área e perímetro de astrócitos observados nos grupos de animais submetidos ao exercício físico de nado nesse estudo implica significativamente no aumento do volume hipocâmpal, uma vez que os astrócitos são o tipo de célula glial mais numerosos no SNC e possuem corpos celulares relativamente grandes. Um estudo realizado em roedores relacionaram o volume hipocâmpal inferior em animais ansiosos e depressivos aos elevados níveis de glicocorticoides encontrados, que podem ser responsáveis pela patologia anatômica e fisiológica do hipocampo, além dos déficits de marcação nos astrócitos por GFAP (ZHANG et al., 2017). O DHA obtido a partir da ingestão do óleo de linhaça possui efeito antioxidante e é transportado para o encéfalo a partir da ligação à albumina pela corrente sanguínea atravessando a barreira hematoencefálica a partir de um complexo aparato de proteínas transportadoras (NELSON, COX, 2014). No sistema glutamatérgico hipocâmpal, o DHA se mostra capaz de modular a atividade de transportadores de glutamato, como GLT-1, EAAC1 e GLAST, além de atuar na restauração da LTP no hipocampo de ratos idosos, promovendo a normalização da liberação desse neurotransmissor e atuar como substância neuroprotetora *in vitro* (ERICKSON et al., 2011).

Conclusões

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou uma associação promissora do exercício físico com suplementação com o óleo de linhaça, beneficiando o ambiente celular e atuando sobre a modulação celular do hipocampo, onde por meio da plasticidade de células gliais apresentou, também, um possível efeito neuroprotetor *in vivo*. Os resultados desse trabalho demonstram que o exercício físico associado a uma suplementação com óleo de linhaça é capaz de alterar a plasticidade de astrócitos GFAP positivos, a expressão de GFAP nas células gliais nas regiões CA1, CA3 e Giro Denteado do hipocampo e que essas alterações são acompanhadas por mudanças morfológicas relacionadas ao aumento de área e perímetro dos astrócitos, sugerindo que essas células participam ativamente da plasticidade hipocâmpal promovida pelo exercício físico e suplementação. Essa associação reforça a utilização de substâncias do tipo ômega-3 como o óleo de linhaça e a execução de exercício físico regular para aumento do volume hipocâmpal e atenuação de doenças neurodegenerativas, promovendo a melhoria do desempenho cognitivo e memória.

Referências bibliográficas

- COBB, J. A. et al. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. **Neuroscience**, v. 316, p. 209–220, 2016.
- ERICKSON KI, VOSS MW, PRAKASH RS, BASAK C, SZABO A, CHADDOCK L. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 108, p. 3017-3022, 2011.
- GOURGOUVELIS J., YIELDER P., MURPHY B. Exercise Promotes Neuroplasticity in Both Health and Depressed Brains: An fMRI Pilot Study. **Neural Plasticity**, v 17, p. 1-13, 2017.
- HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nature reviews neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 58–65, 2008.
- HOWLEY, E. T.; OTHERS. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, p. S364–S369, 2001.
- KUMAR, P., NACHIKET, G., CHATURVEDI, P. C., SINGH, S. R., GEORGE, N., UPADHYAY, A. Mechanisms involved in epigenetic down-regulation of Gfap under maternal hypothyroidism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, p. 375-381, 2018.
- MAYES, P. A. Lipídios de Importância Fisiológica. In: Harper: Bioquímica. 7 ed. São Paulo: Atheneu, p. 142-154, 1994.
- MCMORRIS T, SPROULE J, TURNER A, HALE BJ. Acute, intermediate intensity exercise, and speed and accuracy in working memory tasks: a meta-analytical comparison of effects. **Physiological Behavior**. v. 1, p.102-121, 2011.
- NELSON, D.L., COX, M.M., **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4.ed. New York, W.H. Freeman and Company, 2014.
- SAMPEDRO-PIQUERO P., ANCADA-MENENDEZ Z., AZUCENA BEGEGA, MILAGROS MÉNDEZ, JORGE LUIS A. Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats. **Brain Research**, v. 1502, p. 20-29, 2013.

SARSILMAZ M, SONGUR A, KUS I, OZYURT B, GULEC M, SOGUT S, ILHAN A, AKYOL. The regulatory role of dietary omega-3 fatty acids on oxidant/anti-oxidant balance in the rat hippocampus. **Neuroscience Research Communication** v.33, n.2, p. 114 -123, 2003.

SAUR, L. et al. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 1, p. 293–302, 2014.

SILVA, S. G. DA. Estudo da plasticidade hipocampal induzida pelo exercício físico durante o desenvolvimento cerebral pós-natal de ratos. **Tese de Doutorado em Neurologia e Neurociências**—São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2010.

ZHANG S., WU M., PENG C., ZHAO G., GU R. GFAP expression in injured astrocytes in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, p. 1905-1908, 2017.

ZWAMBORN, R. A. J., SNIJDERS, C., AN, N., THOMSON, A., RUTTEN, B. P. F., & DE NIJS, L. Wnt Signaling in the Hippocampus in Relation to Neurogenesis, Neuroplasticity, Stress and Epigenetics. **Neuroepigenetics and Mental Illness**, v.32, p. 129–157, 2018.