

EFEITOS NEUROTRÓFICOS DO ÓLEO DE PEIXE APÓS ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS JOVENS OU IDOSOS

Claudia Hitomi Huzita (PIBIC/CNPq/), Humberto Milani (Orientador), e-mail: hmilani@uem.br, Daniela Velasquez de Oliveira (Coorientadora), Silvana Regina de Melo (colaboradora), Tuany Bernarde (colaboradora)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Maringá, PR.

Farmacologia – Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: Isquemia cerebral, neuroplasticidade dendritica, óleo de peixe

Resumo:

A lesão cerebral isquêmica resulta em alterações neurológicas permanentes, dentre elas a perda de funções cognitivas, como a memória. Em estudos anteriores observamos que o tratamento com óleo de peixe (OP) protege contra a perda de memória após isquemia cerebral global e transitória (ICGT) em ratos, mesmo na presença de neurodegeneração. Nossa hipótese é que o efeito protetor da memória pelo OP pode estar associado a ações neurotróficas e/ou neuroplásticas do ácido docosahexaenóico (DHA), o principal princípio ativo do OP. Neste projeto nós avaliamos se o tratamento com OP protege contra as alterações dendríticas e protéicas provocadas pela ICGT em ratos. Os resultados demonstraram que o OP protegeu contra a perda de espinhas dendríticas e restaurou a concentração da proteína BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*).

Introdução

Isquemia cerebral global e transitória (ICGT) decorre de situações clínicas que interrompem o fluxo sanguíneo cerebral como um todo, como por exemplo parada cardíaca reversível. O desenvolvimento de estratégias terapêuticas que busquem atenuar os danos neurológicos causados pela ICGT é de extrema importância para a prática médica. Vários estudos sugerem que o ácido docosahexaenóico (ADH), um ácido graxo poliinsaturado da série n-3 (ômega-3) (Belayev et al., 2009), ou formulações padronizadas de óleo de peixe (Bacarin et al., 2016) representam estratégias terapêuticas em potencial capaz de proteger contra os efeitos neurodegenerativos da isquemia cerebral.

O óleo de peixe (OP) é uma das fontes naturais mais ricas em ADH e de fácil acesso para os seres humanos. Em estudos anteriores (Bacarin et al., 2016), o OP demonstrou-se eficaz para proteger contra a perda de memória, apesar de não proteger contra a perda de neurônios piramidais provocada pela ICGT. Entretanto, o OP reduziu a perda da proteína MAP-2

(*microtubule-associated protein 2*) após a isquemia, num período de tempo compatível com seu efeito protetor sobre a memória. A MAP 2 é uma proteína preferencialmente compartimentalizada nos dendritos, e considerada um marcador de neuroplasticidade dendrítica (Zhou et al., 2010). Sendo assim, é possível que o OP estimule os processos de neuroplasticidade sináptica à nível dos dendritos daqueles neurônios que sobrevivem à isquemia.

Objetivo

Este projeto de iniciação científica é parte de um projeto maior, cujo objetivo é avaliar se o tratamento com OP protege contra as alterações provocadas pela ICGT sobre (i) a morfologia dos dendritos de neurônios piramidais que sobrevivem à isquemia, e (ii) a expressão da proteína BDNF.

Materiais e métodos

Animais

Ratos Wistar machos (325 - 400g), mantidos em condições padrão de laboratório foram utilizados.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) falso-isquêmico (*sham*); 2) Sham + OP, 3) Isquemia + veiculo; e 4) Isquemia + OP. O tratamento oral (gavagem) com OP iniciou-se 4 horas após a isquemia e continuou 1 vez/dia, por 7 dias. No 14º. dia pós-isquemia, os cérebros foram examinados para (i) quantificação do número de espinhas dendríticas presentes nos dendritos apicais e basais do hipocampo (subcampos CA1 e CA3), córtex pré-frontal (CPF) e córtex visual (CV), e (ii) concentração de BDNF medida no hipocampo e CPF.

Isquemia

A ICGT foi realizada baseando-se no modelo de oclusão dos 4 vasos, conforme rotina do nosso laboratório.

Análise morfométrica

Os animais foram anestesiados com tionembutal (50 mg/kg) e perfundidos transcárdicamente com solução salina 0,9%, seguida por solução fixativa de PFA a 4%. Os cérebros foram extraídos e processados para coloração de Golgi-Cox (Zaqout & Kaindl, 2016). Para cada animal, 5 a 6 cortes coronais semi-seriados (100 µm de espessura) foram selecionados para quantificação do número de espinhas dendríticas nos dendritos apicais ou basais dos neurônios piramidais do hipocampo (subcampos CA1 e CA3), córtex pré-frontal (CPF) e córtex visual (CV).

Análise Western blotting

Sob anestesia profunda, parte dos animais tiveram seus cérebros extraídos e processados para quantificação da proteína BDNF no hipocampo e CPF. A

técnica de Western blotting foi empregada conforme rotina do nosso laboratório.

Resultados

A figura 2 mostra a perda de espinhas dendríticas provocada pela ICGT em todas as regiões cerebrais examinadas ($p < 0.001 - 0.05$, Isq+vei vs. Sham). O tratamento com OP preservou ou restaurou o número de espinhas dendríticas ($p < 0.001 - 0.05$, Isq+OP vs. Isq+vei). Este efeito foi ainda mais expressivo nos dendritos apicais do córtex visual.

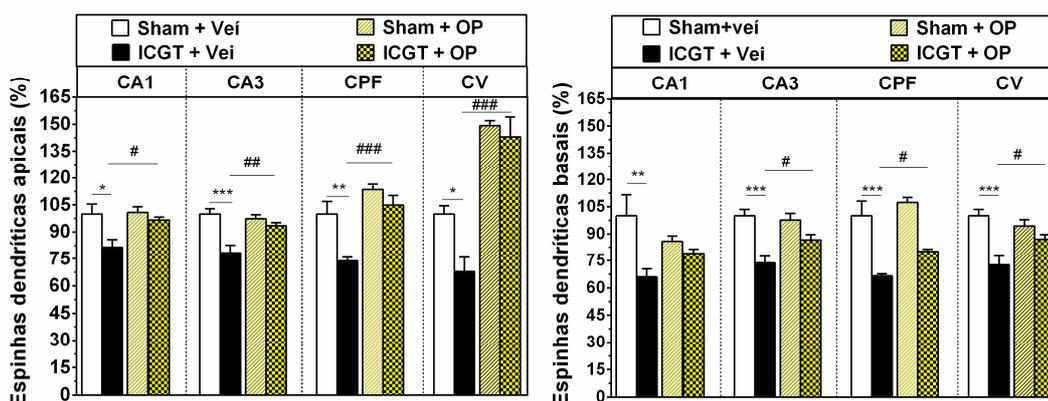


Figura 2. Efeito do OP sobre a perda de de espinhas dendríticas provocada pela ICGT. A densidade de espinhas dendríticas (%) foi estimada no dendritos apicais (gráfico superior) ou basais (gráfico inferior) dos neurônios piramidais do hipocampo (regiões CA1 e CA3), córtex pré-frontal (CPF) e córtex visual (CV). Os valores representam as médias \pm EPM nos diferentes grupos ($n=5-6/\text{grupo}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ vs. Sham+veí; # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$ vs. ICGT 14d.

A figura 3 mostra os efeitos da isquemia sobre a expressão da proteína BDNF na ausência ou presença do OP. A isquemia reduziu a concentração de BDNF tanto no hipocampo quanto no CPF ($p < 0.01-0.001$, Isq+vei vs. Sham). Este efeito foi anulado pelo tratamento com OP em ambas as estruturas cerebrais ($p < 0.001$, isq+OP vs. Isq+vei).

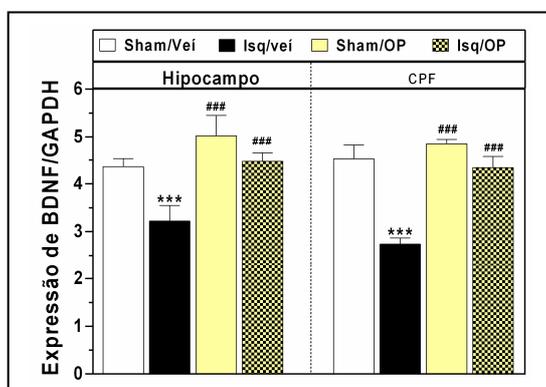


Figura 3. Expressão da proteína BDNF no hipocampo e CPF em ratos isquêmicos tratados ou não com OP. As barras representam as médias \pm EPM ($n= 5-6 / \text{grupo}$). *** $p < 0.001$ vs. sham; ### $p < 0.001$ vs. Isq+vei.

Conclusões

O tratamento com OP iniciado 4 horas pós-isquemia e continuado por 7 dias subsequentes preservou (ou restaurou) as espinhas dendríticas de neurônios piramidais do hipocampo e CPF, bem como impediu a perda da proteína BDNF provocada pela isquemia. Esses resultados sugerem que o efeito do OP em proteger contra a perda de memória, observado repetidamente em estudos anteriores, pode estar associado a uma ação neurotrófica e/ou neuroplástica.

Agradecimentos

Ao CNPq/CAPES, pelo apoio financeiro a este projeto de pesquisa. Às pós-graduandas Daniela Velasquez Oliveira (mestrado) e Jacqueline Godinho (pós-doutorado) pelas orientações recebidas.

Referências

Belayev L; Khoutorova L; Atkins KD; Bazan N G. Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. *Stroke* 2009; 40:3121-3126.

Bacarin CC, Godinho J, de Oliveira RM, Matsushita M, Gohara AK, Cardozo-Filho L, Lima JC, Previdelli IS, Melo SR, Ribeiro MH, Milani H. Postischemic fish oil treatment restores long-term retrograde memory and dendritic density: An analysis of the time window of efficacy. *Behav Brain Res* 2016; 311:425-39.

Zaqout S, Kaindl AM. Golgi-Cox Staining Step by Step. *Front Neuroanat*. 2016; 10:38.