

## ANÁLISE NEUROQUÍMICA DE SINAPSINA E PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL EM NEONATOS COM HIPÓXIA-ISQUEMIA DE FÊMEAS SUBMETIDAS AO NADO GESTACIONAL.

WILLIAN ROBERTO DA SILVA BOTELHO<sup>1</sup>; BRUNA FERRARY DENIZ<sup>2</sup>

Universidade Federal de Pelotas – will.r.botelho@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas - deniz.bf@outlook.com

### 1. INTRODUÇÃO

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal representa um dos principais determinantes da mortalidade no período neonatal e está implicada como um fator etiológico em diversas condições neurológicas subsequentes, incluindo o Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) e a paralisia cerebral (McKenna et al., 2015; Volpi, 2009). O exercício físico durante a gestação tem o potencial de aprimorar o perfil imunológico dos neonatos, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias no sistema (Cotman e Berchtold, 2002).

Ademais, a janela terapêutica gestacional é postulada como uma estratégia promissora para prevenir danos durante os períodos críticos do desenvolvimento fetal. No entanto, essa abordagem ainda é subexplorada no contexto da prática de exercício físico, apesar de evidências substanciais que demonstram que a atividade física materna pode reduzir fatores de risco como pré-eclâmpsia, insuficiência placentária, diabetes gestacional e obesidade, ao promover um ambiente intrauterino mais saudável e favorável ao desenvolvimento fetal (Barakat et al., 2015).

Além disso, o exercício durante a gestação também melhora o aprendizado espacial, estimula a proliferação celular e a neurogênese no hipocampo, e aumenta os níveis de proteínas sinápticas, como a sinapsina e sinaptofisina (Parnpiansil et al., 2003). Nessa perspectiva, é possível que o exercício físico possa desempenhar uma função importante na neuroproteção contra danos que possam impactar o sistema nervoso central da prole. Diversas táticas neuroprotetoras podem ser empregadas para diminuir os danos causados pela HI, dentre elas o exercício físico é uma técnica não-farmacológica que tem sido bastante usada. A natação é uma das técnicas de exercício físico mais importantes, pois tem baixo impacto nas articulações e pode diminuir complicações durante a gravidez. Portanto, é um

exercício adequado para o período gestacional e pode trazer benefícios para a mãe e o feto.

## 2. METODOLOGIA

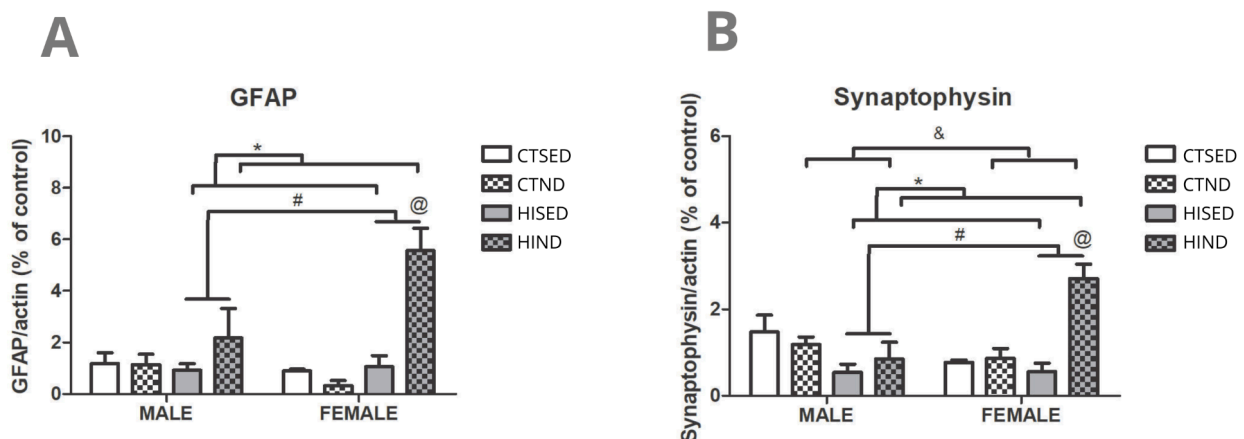
Em primeiro lugar, é fundamental destacar que todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS, nº 35785, e seguiram a Lei Arouca nº 11.794/2008 e o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institute of Health (NIH). Para este experimento, foram utilizados ratos wistar, machos e fêmeas, com aproximadamente 75 dias de vida.

Como primeira etapa metodológica, as fêmeas foram acasaladas (2:1) com os machos após um período de adaptação ao protocolo de natação. O dia gestacional (GD) 0 foi considerado quando a gravidez foi confirmada e o protocolo de treinamento foi iniciado. As fêmeas sedentárias (SED) e nadadoras (ND) foram categorizadas aleatoriamente e o treinamento foi conduzido em um recipiente utilizado para a tarefa do Morris Water Maze (medindo 110 cm x 50 cm) com água a 27°C. Uma semana antes do acasalamento, as fêmeas foram ambientadas à piscina de natação de maneira gradual: 5 minutos no primeiro dia, 10 minutos nos segundos e terceiro dias e, por último, 20 minutos nos dois dias seguintes. Após a confirmação da gravidez, as ratas ND foram treinadas todos os dias, durante 20 minutos, até o parto (Sanches et al., 2021).

Após 7 dias do nascimento dos filhotes das fêmeas ND e SED, os mesmos tiveram uma hipóxia-isquemia induzida: Estes filhotes foram anestesiados com isoflurano (4% para induzir e 2% para manter), e foi realizada uma incisão na superfície ventral do pescoço, tornando exposta a artéria carótida comum direita. Na sequência, ela foi isolada e permanentemente ocluída. Depois disso, os animais HI foram devolvidos às suas mães para um período de recuperação de 2 horas e, em seguida, foram submetidos a um ambiente hipóxico com 8% de O<sub>2</sub> e 92% de N<sub>2</sub> durante 60 minutos com temperatura controlada (Confortim et al., 2019; Deniz et al., 2018).

Vinte quatro horas após, os filhotes HI foram eutanasiados por decapitação e o hipocampo direito foi separado. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas (1:10) em tampão de fosfato de sódio 20 mM com 140 mM KCl e centrifugadas a 4°C por 10 min a 3000 rpm.

Para a quantificação de GFAP (proteína exclusivamente expressa em astrócitos no sistema nervoso central), e Sinapsina (proteína associada às vesículas sinápticas que regula a liberação de neurotransmissores), foi realizada a análise por western blot. Após a separação das proteínas em um gel de eletroforese (10% SDS-PAGE) com 30 µg de proteína por trilha, elas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, bloqueadas com 4% de leite e incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-GFAP (1:1000, Santa Cruz) e anti-sinapsina 1 (1:1000, Sigma-Aldrich). Em seguida, as membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, reveladas e quantificadas no Software ImageJ.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise post-hoc indicou que o grupo HIND teve um maior conteúdo de GFAP em comparação com o grupo HISED. Evidenciando uma maior quantidade de astrócitos na amostra utilizada. Observa-se, também, que o grupo HIND demonstrou um aumento no conteúdo de Sinapsina em comparação com o grupo HISED, apontando, provavelmente, um melhor desempenho no transporte de neurotransmissores do neurônio pré-sináptico para o pós-sináptico. Além disso, observou-se que a expressão de Sinapsina e GFAP se mostrou aumentada nas fêmeas da espécie, demonstrando dimorfismo sexual e corroborando a importância do nado no período gestacional. Portanto, a melhora nesses parâmetros podem estar relacionadas com o desenvolvimento cognitivo, como já encontrado na literatura existente.

#### 4. CONCLUSÕES

Isto posto, conclui-se que a natação materna foi capaz de afetar positivamente a resposta à HI nos cérebros das proles, de maneira dependente do sexo, adicionando informações relevantes sobre a neuroproteção pelo exercício materno e destacando a importância das proteínas Sinapsina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como alvo terapêutico para a neuropatologia hipóxia-isquemia neonatal.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295–301.

doi:10.1016/S0166-2236(02)02143-4

McKenna, M.C., Scafidi, S., Robertson, C.L., 2015. Metabolic Alterations in Developing Brain After Injury: Knowns and Unknowns. *Neurochem. Res.* 40, 2527-2543.

doi:10.1007/s11064-015-1600-7

Volpe, J.J., 2009. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Semin Pediatr Neurol* 16, 167–178. doi:S1071-9091(09)00063-1 [pii] 10.1016/j.spen.2009.09.005

Barakat, R., Perales, M., Garatachea, N., Ruiz, J.R., Lucia, A., 2015. Exercise during pregnancy. A narrative review asking: what do we know? *Br. J. Sports Med.* 49, 1377- 1381.

doi:10.1136/bjsports-2015-094756

Parnpiansil, P., Jutapakdeegul, N., Chentanez, T., Kotchabhakdi, N., 2003. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci. Lett.* 352, 45-48.

doi:10.1016/j.neulet.2003.08.023

SANCHES, E. F. *et al.* Pregnancy swimming prevents early brain mitochondrial dysfunction and causes sex-related long-term neuroprotection following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Experimental Neurology*, v. 339, 1 maio 2021.

CONFORTIM, H. D. *et al.* Neonatal hypoxia-ischemia caused mild motor dysfunction, recovered by acrobatic training, without affecting morphological structures involved in motor control in rats. *Brain Research*, v. 1707, 2019.

DENIZ, B. F. *et al.* Folic acid supplementation during pregnancy prevents cognitive impairments and BDNF imbalance in the hippocampus of the offspring after neonatal hypoxia-ischemia. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 60, p. 35–46, out. 2018.