

# ANÁLISE DA ARBORIZAÇÃO DENDRÍTICA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE GOLGI-COX EM RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO CÉREBRO

Marcela J.O.A. Carreira<sup>1</sup>; Sérgio Gomes da Silva<sup>2</sup>

Estudante de Ciências Biológicas; e-mail: marcelaacarreira@hotmail.com<sup>1</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: sgomesilva@hotmail.com<sup>2</sup>

Área de Conhecimento: Fisiologia de Órgãos e Sistemas

Palavras-chave: Desenvolvimento cerebral; arborização dendrítica; neurogênese; técnica Golgi-Cox

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso central é um processo complexo e estímulos durante esse período altamente plástico pode influenciar a maturação funcional do cérebro e determinar a sua integridade ao longo da vida. Estudos em humanos e animais têm mostrado que estímulos ambientais como hábitos de exercício físico durante a infância e adolescência podem ser favoráveis para o desenvolvimento do sistema nervoso (KIM et al., 2004; BUCK et al., 2008; HILLMAN et al., 2009; GOMES DA SILVA et al., 2012). Tem sido observado que o exercício durante o desenvolvimento cerebral pós-natal de ratos aumenta densidade de axônios e neurônios, eleva os níveis cerebrais de fatores neurotróficos e melhora aprendizagem e memória (KIM et al., 2004; GOMES DA SILVA et al., 2012). É provável que tais efeitos ocorram porque o exercício físico juvenil produz um melhor desenvolvimento neuronal. Além disso, esses efeitos podem acontecer porque a plasticidade neuronal é maior na adolescência que na vida adulta. De fato, descobertas recentes têm demonstrado que hábitos de exercício físico na infância e adolescência produzem efeitos mais robustos e duradouros que na fase adulta (HOPKINS; NITECKI; BUCCI, 2011). Baseado nessas observações, a proposta do presente trabalho foi testar se a prática de exercício físico durante o período pós-natal do desenvolvimento do cérebro resulta no desenvolvimento de circuitos neuronais mais complexos, capazes de aumentar a arborização dendrítica de neurônios corticais. Para isso, a complexidade neuronal foi investigada através da técnica de Golgi-Cox em ratos submetidos a um programa de exercício físico durante o período adolescente (de 21 a 60 dias de vida).

## OBJETIVO GERAL

Avaliar se a prática de exercício físico durante o período pós-natal do desenvolvimento do cérebro resulta no desenvolvimento de circuitos neuronais mais complexos.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar a arborização dendrítica através da técnica de Golgi-Cox em ratos submetidos a exercício físico durante o desenvolvimento pós-natal do cérebro.

## METODOS

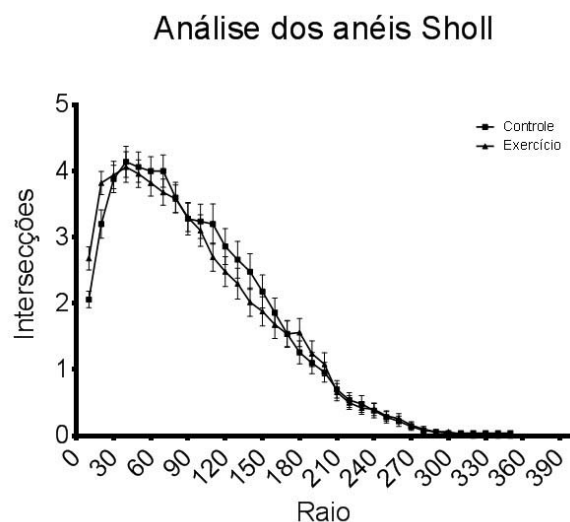
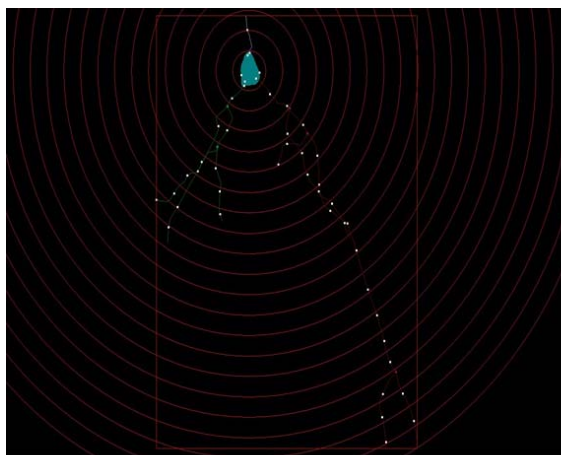
Foram utilizados doze animais da linhagem Wistar, sendo eles divididos em dois grupos, o grupo controle (n=6), e o grupo exercício (n=6). O protocolo de treinamento dos animais do grupo exercício foi realizado de acordo com o trabalho de Gomes da Silva et al. (2010), com seu início aos 21 dias de idade (P21), e fim aos 60 dias de idade dos animais (P60). O treinamento foi realizado em esteiras motorizadas (Columbus Instruments), com período de aquecimento de 5 min a 8 m/min. Gradativamente durante os dias subsequentes, o tempo e a velocidade foram aumentados, até atingir 18 m/min durante 60 min. Após os 60 dias os

encéfalos foram isolados, e utilizamos a técnica de Golgi-Cox para marcar os neurônios. A técnica de Golgi-Cox tem sido muito utilizada para verificar, de forma mais precisa, a morfologia neuronal, em ratos de diferentes idades. Esta técnica é capaz de caracterizar os diferentes tipos de neurônios sem corar intensamente os vasos sanguíneos, o que produz uma melhor visualização de neurônios em diversas regiões do cérebro, como na amígdala e no hipocampo (regiões do cérebro relacionadas à processos cognitivos e emocionais) (GIBB et al., 1998). No nosso estudo, foram reconstruídos, em 3D, a arborização dendrítica de 120 neurônios (10 neurônios por animal). Através um sistema computadorizado de captura e análise de imagens (Neurolucida, MBF Biosciences), no qual as reconstruções foram analisadas pelos anéis de *Sholl* para verificar a complexidade da arborização dendrítica. Para comparar o número de cruzamentos, o número de bifurcações e o comprimento de cada ramo dendrítico em cada grupo estudado (grupo exercício e grupo controle), foram utilizados o teste t de Student e a ANOVA.

## RESULTADOS/DISCUSSÃO

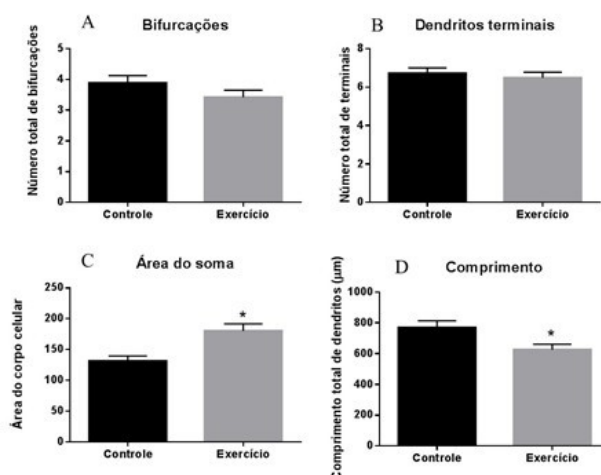
As reconstruções foram analisadas pelos anéis de Sholl para verificar a complexidade da arborização dendrítica (Figura 1A). Através dessa análise, podemos notar a presença de intersecções (ramificações dos dendritos) (PINCHAS; BARANES, 2013). Na literatura já é sabido que o exercício físico aumenta a plasticidade neuronal em ratos adultos e idosos e melhora a doença de Alzheimer e epilepsia (EADIE; REDILA; CHRISTIE, 2005; GOMES DA SILVA; ARIDA, 2015). Em nosso estudo, a análise da citoarquitetura neuronal apontou que o número de intersecções e o tamanho dos dendritos não foram significativamente diferentes entre os grupos controle e exercício (Figura 1B). Esses dados não estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (HOPKINS; NITECKI; BUCCI, 2011; LIN et al., 2012). Por exemplo, Lin et al. (2012) encontraram que animais exercitados obtiveram um aumento significativo de intersecções e o tamanho dos dendritos quando comparados ao grupo de animais sedentários com 35 dias de idade. Talvez esses achados divergentes tenham ocorrido porque os animais utilizados no presente trabalho terminaram o protocolo de exercício com 60 dias enquanto que Hoffman (2016) utilizaram animais com 70 dias de idade que corriam 15 minutos, 5 dias por semana, em velocidade inferior à nossa. Em outras palavras, é provável que a idade dos animais e protocolo de treinamento tenham influenciado nos resultados finais e, por isso, nossos dados estejam diferentes dos encontrados na da literatura (LIN et al., 2012; HOFFMAN et al., 2016).

*Figura 1- Arborização dendrítica e análise dos anéis de Sholl (A); Gráfico mostrando o número de intersecções e o tamanho dos dendritos (B)*



Nenhuma alteração significativa foi encontrada entre os grupos estudados (exercício e controle) no número de bifurcações e dendritos terminais (Figura 2A e 2B). Em relação a área do corpo do neurônio (Figura 2C), foi visto que o grupo que realizou o exercício físico obteve uma área maior do que a do grupo controle, o que corrobora com a literatura (EADIE; REDILA; CHRISTIE, 2005; REDILA; CHRISTIE, 2006). Por outro lado, o comprimento do dendrito do grupo exercício foi menor que o grupo controle. Esses últimos resultados são divergentes, e a literatura mostra que mudanças no comprimento dos dendritos podem ocorrer, ou não (FAHERTY; KERLEY; SMEYNE, 2003; REDILA; CHRISTIE, 2006). No trabalho de Faherty (2003), o exercício físico não interferiu no volume e no comprimento dos dendritos em camundongos adultos submetidos ao treinamento de corrida, enquanto que no trabalho de Redila (2006), animais que fizeram exercício voluntário obtiveram um maior comprimento que os animais controle. No presente estudo essa divergência nos resultados pode ter ocorrido devido a técnica de Golgi-Cox dos grupos estudados ter sido realizada em dias diferentes na qual as marcações dos grupos ficaram diferentes, devido a isto as células escolhidas para o desenho também podem ter acarretado esta diferença brusca do controle.

Figura 1- Análise da bifurcação (A), dendritos terminais (B), área do corpo celular (C) e comprimento dos dendritos (D). \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



## CONCLUSÕES FINAIS

- 1) No presente estudo, o protocolo de exercício físico foi eficaz para induzir treinamento aos animais. Todos os animais em desenvolvimento foram bons corredores, resultando em uma treinabilidade similar aquela obtida por Gomes da Silva e colaboradores (2010; 2012).
- 2) A marcação de Golgi-Cox no nosso estudo foi similar a descrita por Narayanan et al. (2014). Foi obtida uma clara marcação de neurônios da região hipocampal dos grupos estudados.
- 3) A reconstrução 3D de neurônios da região hipocampal tem, nitidamente, apresentado as características neuronais do corpo celular, arborização dendrítica, e bifurcações. Apesar de trabalhosa, essa técnica cumpriu todos objetivos proposto no presente estudo: analisar a arborização dendrítica através da técnica de Golgi-Cox em ratos submetidos a exercício físico durante o desenvolvimento pós-natal do cérebro
- 4) Como foi dito anteriormente, as análises de *Sholl*, juntamente com os dados de bifurcações e dendritos terminais, não apresentaram diferença entre os grupos. Podemos inferir que o exercício físico não influenciou na complexidade neuronal, apenas na área do soma, no qual o exercício se mostrou maior que o grupo controle. Entretanto, vale ressaltar que falhas metodológicas foram identificadas (células em diferentes formatos e com diferentes marcações) e, dessa forma, mais estudos são necessários para chegar a uma conclusão da pergunta do

trabalho: a prática de exercício físico durante o período pós-natal do desenvolvimento do cérebro resulta no desenvolvimento de circuitos neuronais mais complexos?

## REFERÊNCIAS

BUCK, S. M.; HILLMAN, C. H.; CASTELLI, D. M. The relation of aerobic fitness to stroop task performance in preadolescent children. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 1, p. 166-172, 2008.

EADIE, B. D.; REDILA, V. A.; CHRISTIE, B. R. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. **J Comp Neurol**, v. 486, n. 1, p. 39-47, 2005.

FAHERTY, C. J.; KERLEY, D.; SMEYNE, R. J. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 141, n. 1-2, p. 55-61, 2003.

GIBB, R.; KOLB, B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. **J Neurosci Methods**, v. 79, n.

GOMES DA SILVA, S.; DONA, F.; DA SILVA FERNANDES, M. J.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; ARIDA, R. M. Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. **Brain Dev**, v. 32, n. 2, p. 137-142, 2010.

HILLMAN, C. H.; PONTIFEX, M. B.; RAINE, L. B.; CASTELLI, D. M.; HALL, E. E.; KRAMER, A. F. The effect of acute treadmill walking on cognitive control and academic achievement in preadolescent children. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 1044-1054, 2009.

HOPKINS, M. E.; NITECKI, R.; BUCCI, D. J. Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**, v. 194, n., p. 84-94, 2011.

KIM, Y. P.; KIM, H.; SHIN, M. S.; CHANG, H. K.; JANG, M. H.; SHIN, M. C.; LEE, S. J.; LEE, H. H.; YOON, J. H.; JEONG, I. G.; KIM, C. J. Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. **Neurosci Lett**, v. 355, n. 1-2, p. 152-154, 2004.

LEVINE, N. D.; RADEMACHER, D. J.; COLLIER, T. J.; O'MALLEY, J. A.; KELLS, A. P.; SAN SEBASTIAN, W.; BANKIEWICZ, K. S.; STEECE-COLLIER, K. Advances in thin tissue Golgi-Cox impregnation: fast, reliable methods for multi-assay analyses in rodent and non-human primate brain. **J Neurosci Methods**, v. 213, n. 2, p. 214-227, 2013.

LIN, T. W.; CHEN, S. J.; HUANG, T. Y.; CHANG, C. Y.; CHUANG, J. I.; WU, F. S.; KUO, Y. M.; JEN, C. J. Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. **Neurobiol Learn Mem**, v. 97, n. 1, p. 140-147, 2012.