O EXERCÍCIO FÍSICO E COGNITIVO IMPEDEM DÉFICITS DE MEMÓRIA EM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER

Caroline Bitencourt Soares [1]

Luiza Freitas Lopes [2]

Alexandre Garcia dos Santos [3]

Pamela Billing Mello Carpes [4]

Leticia Rossi Daré [5]

Resumo:

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa com perda gradual da memória, morte neuronal e desordem da estrutura e função do sistema nervoso. É caracterizada pelo acúmulo de placas de proteína -amilóide (A) que resultam em neurotoxicidade e dano oxidativo. O exercício físico e a estimulação cognitiva tem importantes efeitos na memória e no aprendizado. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico e cognitivo na prevenção de déficits de memória e estresse oxidativo hipocampal relacionados à neurotoxicidade induzida pela proteína -amilóide. Foram utilizados 72 ratos Wistar machos, divididos em: Controle; A; Exercício Físico (EF); Exercício Cognitivo (EC); A + EF; A + EC. O EF foi realizado em esteira própria para roedores, 30 min/dia, 3x por semana, durante 4 semanas. O EC foi realizado diariamente durante 4 semanas, utilizando o protocolo do Labirinto de Barnes adaptado. Após a intervenção (EF e EC), os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de A ou salina. Após 10 dias necessários para agregação das placas, a memória de curto (MCP) e de longo prazo (MLP) foram avaliadas através da Tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO). Para avaliação do estresse oxidativo foram realizados ensaios bioquímicos: níveis de espécies reativas de oxigênio (DCFH), peroxidação lipídica por substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total por redução/poder antioxidante (FRAP). Os dados do RO foram analisados por meio do teste-t de uma amostra, considerando uma média teórica de 50% e os resultados bioquímicos pelo ANOVA de uma via seguida pelo post hoc de Tukey, com nível de significância de P

Palavras-chave: Exercício físico; Exercício Cognitivo; Alzheimer

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

O EXERCÍCIO FÍSICO E COGNITIVO IMPEDEM DÉFICITS DE MEMÓRIA EM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER

[1] Aluno de graduação. carolinebitencourt.s@gmail.com. Autor principal

[2] Aluna da graduação . freitaaslopes@gmail.com. Co-autor

[3] Aluno da graduação . alexandregarcia16@gmail.com. Co-autor

[4] Docente. pamelacarpes@unipampa.edu.br. Orientador

[5] Aluna de pós graduação . leticiadare@unipampa.edu.br. Co-orientador

O EXERCÍCIO FÍSICO E O EXERCÍCIO COGNITIVO IMPEDEM DÉFICITS DE MEMÓRIA RELACIONADOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva crônica caracterizada pela perda gradual da memória, com morte de neurônios e desordem da estrutura e função do sistema nervoso. Estima-se que a DA afeta mais de 36 milhões de pessoas no mundo (INTERNATIONAL, A.S.D, 2015). As características patológicas da doença, que se relacionam com as perdas neuronais, incluem o acúmulo de placas senis extracelulares contendo proteína β-amilóide (Aβ) e emaranhados neurofibrilares da proteína tau (ABRAZ, 2016). A deposição de Aβ resulta em neurotoxicidade e dano oxidativo, um fator central na patogênese da DA (SVENSSON, et al., 2014).

Muitos estudos têm sido realizados na busca por terapias alternativas que possam auxiliar no tratamento da doença e na qualidade de vida dos pacientes. Além do uso de medicamentos, intervenções sem o uso de fármacos, como a estimulação física, cognitiva e social, são alternativas promissoras. O exercício físico é conhecido por ter importantes efeitos preventivos nas doenças neurodegenerativas demonstrando melhora nos déficits cognitivos relacionados à demência (VAYNMAN, et al., 2006).

Por outro lado, estudos identificaram benefícios da estimulação cognitiva em modelos dessas patologias, tais como a melhora no desempenho de tarefas cognitivas, atuando na prevenção a progressão do declínio cognitivo, atenuando os déficits de memória e aprendizado no hipocampo característicos da DA (MARTINEZ-CORIA, et al., 2015). Entretanto, é preciso esclarecer se os efeitos da estimulação cognitiva na prevenção da DA são comparáveis com aqueles observados para o exercício físico crônico.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício físico e do exercício cognitivo na prevenção de déficits de memória e estresse oxidativo hipocampal relacionados à neurotoxicidade induzida pelo acúmulo de proteína beta-amilóide em ratos.

2 METODOLOGIA

Foram utilizados 72 ratos Wistar machos com 60 dias de vida, divididos seis grupos (n = 12/grupo): Controle; Aβ; Exercício Físico (EF); Exercício Cognitivo (EC); Aβ + EF; Aβ + EC. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA/Unipampa (protocolo 014/2017).

O EF foi realizado em esteira rolante própria para roedores, 30 min/dia, três vezes por semana, durante 4 semanas. Todos os animais foram adaptados na esteira uma semana antes do início do experimento, o que consistiu em um período de habituação inicial à esteira (durante dois dias, com velocidade de 2 a 5 m/min por 10 minutos) e um período para o "protocolo do bom corredor", que consistiu em colocar os animais na esteira (8 m/min por 10 min) sem inclinação e avaliar o nível de treinabilidade por três dias consecutivos (ARIDA, et al., 2011). O desempenho do animal na esteira foi pontuado em um intervalo de 1 a 5 pontos e no final os animais que tiverem uma média de três ou mais pontos foram incluídos nos grupos de exercício físico (ARIDA, et al., 2011).

O EC foi realizado diariamente durante 4 semanas, utilizando o protocolo do Labirinto de Barnes adaptado (BARNES, 1979) para um treinamento cognitivo, e não como um teste de memória espacial, como é geralmente utilizado. Durante a tarefa, os animais foram colocados no meio de uma plataforma circular contendo buracos nas bordas, com uma caixa de escape escura, localizada em um dos buracos. No treinamento, os animais receberam um reforço negativo, na forma de luz forte, motivando-os a buscar a caixa escape. Foi avaliada a latência e o número de buracos errados antes de encontrar o buraco alvo ao longo dos treinos.

Após 4 semanas de intervenções, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para induzir toxicidade Aβ ou submetidos a cirurgia simulada com injeção salina (grupos sham). Para cirurgia os animais foram anestesiados e fixados no aparelho estereotáxico. Foi realizado infusão intrahipocampal de 2 µl da proteína βa /ou salina na região CA1 do hipocampo bilateralmente, seguindo as coordenadas de Paxinos & Watson (1998). Após 10 dias de recuperação cirúrgica, tempo necessário para indução dos efeitos da injeção da proteína βa, agregação e formação de placas amiloides os animais foram submetidos aos experimentos comportamentais

A memória de curto prazo (MCP) e memória de longo prazo (MLP) foram avaliadas através da Tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO). Para a tarefa de RO utiliza-se um aparato consistindo em uma caixa quadrada, onde primeiramente é realizada habituação do animal para livre exploração do ambiente durante 4 dias/20 minutos por dia. No quinto dia o animal é submetido à sessão de treino, que consiste na exposição do animal a dois objetos desconhecidos (A e B) para exploração e contabilização do tempo de exploração de cada objeto durante 5 minutos. Nas sessões de teste um dos objetos colocados no treino é substituído por um objeto novo. Espera-se que, se o animal aprendeu, explore mais o objeto novo, já que lembra do objeto conhecido (ENNACEUR, et al., 1988)

Os ensaios bioquímicos para determinação do estado oxidativo hipocampal foram desenvolvidos através da mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DCFH - LOETCHUTINAT, et al., 2005), peroxidação lipídica (por substância reativa ao ácido tiobarbitúrico(TBARS – OHKAWA, 1979) e capacidade antioxidante total por redução/poder antioxidante (FRAP - BENZIE, et al., 1996).

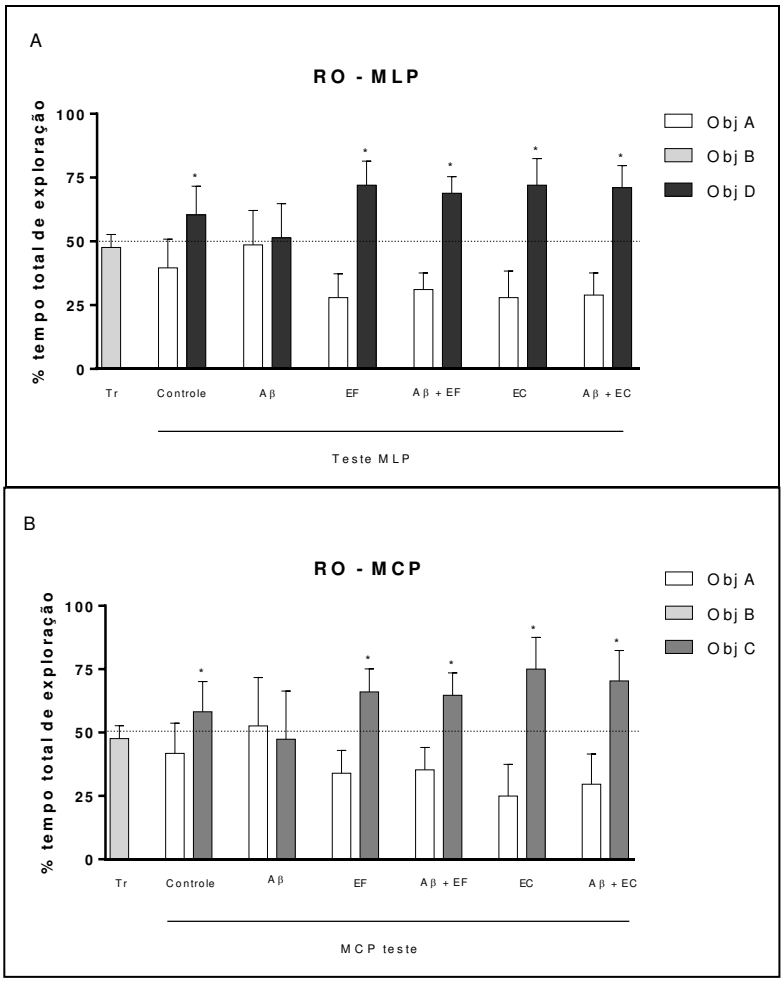
Para análise estatística os resultados dos testes de RO foram convertidos em percentual do tempo total de exploração e analisados por meio do teste-t de uma amostra, considerando uma média teórica de 50%. Os resultados das análises bioquímicas dos diferentes grupos foram comparados utilizando uma ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey. O nível de significância considerado em todas as análises foi de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de memória de RO de curta (MCP) e de longa duração (MLP) apresentaram resultados semelhantes (Fig. 1). O grupo controle não apresentou déficits cognitivos [MCP: $P = 0,0230$; MLP: $P = 0,0042$]. Os animais do grupo Aβ apresentaram déficits de memória, pois passaram um tempo semelhante explorando o objeto familiar e o novo objeto [MCP: $P = 0,6095$; MLP: $P = 0,7128$], o que é esperado devido as alterações fisiológicas acarretadas pela injeção da proteína Aβ.

Foi possível observar que os animais infundidos com Aβ que foram submetidos aos exercícios físicos e cognitivos, foram capazes de minimizar os déficits provocados pela neurotoxicidade induzida pela Aβ e apresentaram diferença significantes nos testes, demonstrando que foram capazes de formar MCD (Aβ+EF: $P = 0,0003$; Aβ+EC: $P = 0,0001$) e MLD (Aβ+EF: $P = 0,0001$; Aβ+EC: $P = 0,0001$) (Fig. 1A).

Figura. 1. Aβ prejudica a memória de curta (A) e de longa duração (B) na memória de RO. EF e EC melhoram os déficits de memória, tanto em animais sham quanto DA. Dados apresentados em média e desvio padrão da porcentagem do tempo total de exploração aos objetos (*$P < 0,05$ no teste t uma amostra, considerando a média teórica de 50% (n=12 por grupo). Controle, Aβ (Alzheimer); EF (exercício físico); Aβ + EF; EC (Exercício cognitivo); Aβ + EC.

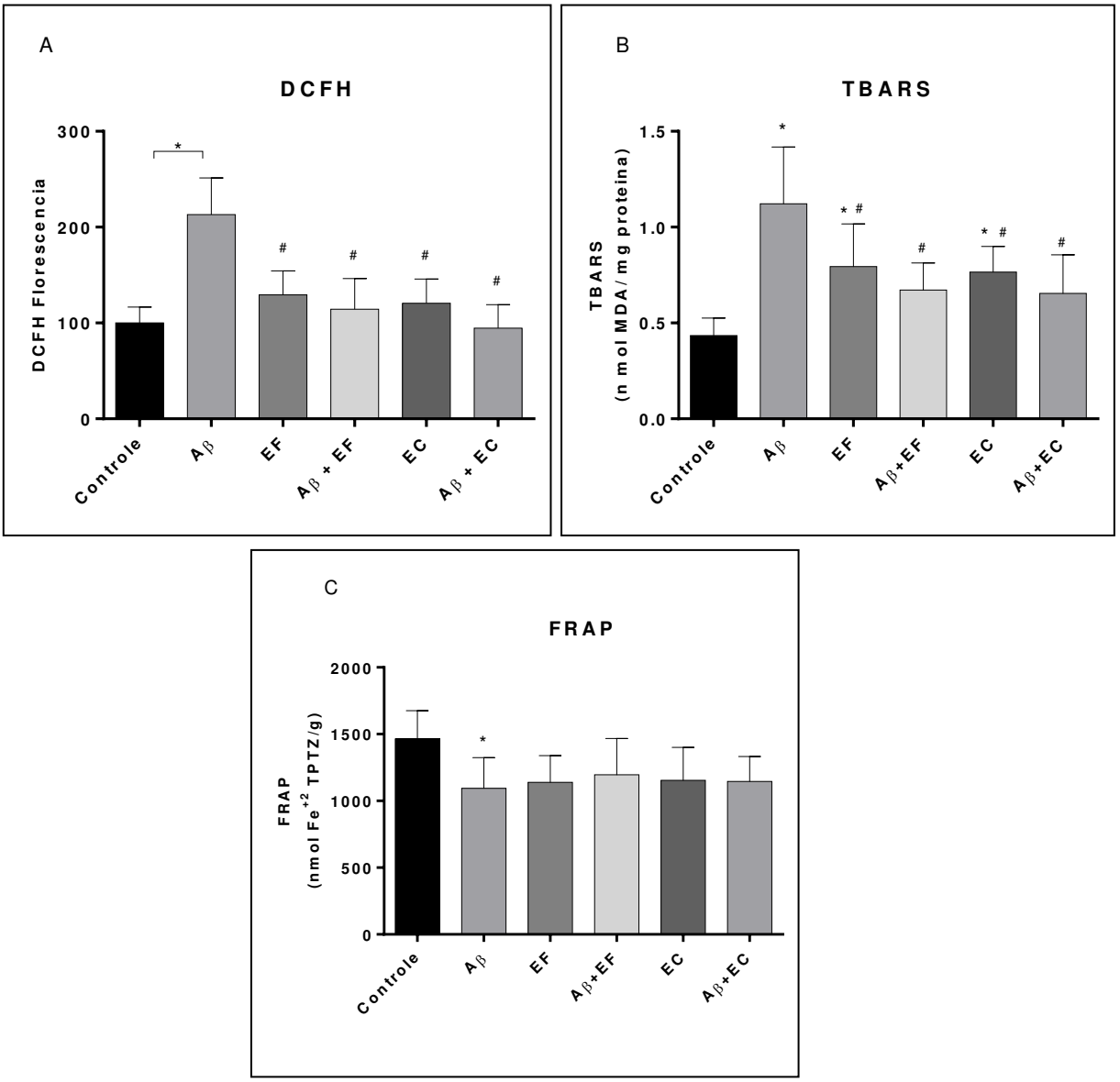


Os dados bioquímicos mostraram um aumento significativo nos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) do hipocampo dos animais do grupo Aβ em comparação com os animais do grupo controle (P = 0,0001) (Fig.2A). O aumento dos níveis de EROs pode ser explicado pelo fato da proteína Aβ levar a ativação significante de proteínas quinases (MAPK p38) que promovem a ativação das células da glia e neuroinflamação (GIOVANNINI, et al., 2002).

Os animais que receberam Aβ apresentaram maior peroxidação lipídica hipocampal em comparação que ratos controle (P= 0,0001) (Fig.2B). Isso porque o estresse oxidativo leva a peroxidação lipídica da célula, afetando assim a função das células nervosas (DI DOMENICO, et al., 2017). Um efeito preventivo do EF e EC foi observado, já que ratos submetidos a exercício físico e cognitivo apresentaram menor peroxidação lipídica que animais Aβ não submetidos a nenhuma intervenção (Aβ+EF: P = 0,0006; Aβ+EC: P = 0,0003) (Fig.2B).

Através da FRAP, foi possível verificar que o grupo Aβ apresentou menor capacidade antioxidante total do que o grupo controle (P = 0,0421). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os outros grupos (Fig. 2C).

Figura. 2. Dados bioquímicos referentes aos níveis de espécies reativas de oxigênio (A), peroxidação lipídica (B) e capacidade antioxidante total (C). Dados apresentados em média e desvio padrão, comparados utilizando uma ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Tukey (*p<0,05 comparados ao grupo Controle; #p<0,05 comparado ao grupo Aβ). Controle, Aβ (Alzheimer); EF (exercício físico); Aβ + EF; EC (Exercício cognitivo); Aβ + EC.



Tais resultados demonstram que o EF e EC, são potentes agentes capazes de atenuar os déficits relacionados a DA. Estudos também demonstraram que a EC é capaz de promover alterações na plasticidade sináptica e capacidade de aprendizagem (SEHGAL, et al., 2013). E além disso, o EF apresenta-se como um importante fator neuroprotetor e, de acordo com um estudo prévio, é capaz de reduzir os níveis da proteína Aβ, melhorando a capacidade cognitiva (KOO, et al., 2017).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infusão de Aβ, característica da doença de Alzheimer, resultou em déficits de memória, estresse e dano oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante total no hipocampo. O exercício físico e o exercício cognitivo foram capazes de impedir os déficits de memória, além de diminuir o estresse e o dano oxidativo hipocampal.

REFERÊNCIAS

ABRAZ, **Associação Brasileira de Alzheimer**. Disponível <http://www.abraz.org.br/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer>. Acesso em: jan. 2018.

ARIDA, R. M. et al. Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v. 90, n. 6, p. 452-465, jun. 2011.

BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. J. Comp. **Physiol. Psychol**. v. 93, p. 74–104, fev. 1979.

BENZIE I.F.; STRAIN J.J,The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Anal Biochem** v. 239, p.70-76, jul. 1996

ENNACEUR A.; DELACOUR J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.. **Behav Brain Res**. P.47–59, 1988.

GIOVANNINI, M. G. et al. β-Amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. **Neurobiology of disease**, v. 11, n. 2, p. 257-274, nov. 2002.

INTERNATIONAL, A.s.D . The global impact of dementia: an analysis of pervalence, incidence, cost and trends, in World Alzheimer Report. London: International, A.s.D; 2015.

KOO, J.H; KANG, E.B; YANG D.E.; et al. Treadmill exercise decreases amyloid-β burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, fev. 2017.

LOETCHUTINAT C., et al.Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate assay**. Radiat Phys Chem** v. 72, p. 323–331, fev. 2005.

MARTINEZ-CORIA H.; YEUNG S.T.; AGER R.R.; et al. Repeated cognitive stimulation alleviates memory impairments in an Alzheimer's disease mouse model. **Brain Res Bu**ll, jul. 2015.

OHKAWA K. Promotion of renewal canes in greenhouse roses by 6-benzylaminopurine without cutback. **HortScience** v. 5, p. 612–61, jul. 1979

SEHGAL, M.C.; SONG, V.L.; EHLERS, J.R.; et al. Learning to learn - intrinsic plasticity as a metaplasticity mechanism for memory formation**. Neurobiol Learn Mem**, jul. 2013.

SVENSSON, M.; LEXELL, J.; DEIERBORG, T. Effects of physical exercise on neuroinflammation, neuroplasticity, neurodegeneration, and behavior: what we can learn from animal models in clinical settings. **Neurorehabil.Neural Repair,** dez. 2014.

VAYNMAN S.S.; YING Z.; YIN D, et al. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. **Brain research,** jan. 2006.