

Expressão do microRNA-27b em ratos submetidos ao Exercício Físico e Isquemia Cerebral Experimental

Autores: Brenno Marco De Russi¹, Camila Albuquerque Melo de Carvalho²

^{1,2} Centro Universitário Barão de Mauá

¹ *brennomr@live.com*, ² *camila.melo@baraodemaua.br*

Resumo

Novas pesquisas demonstram que a associação do exercício físico com a expressão de microRNAs traz importantes resultados para o entendimento da fisiopatologia da isquemia cerebral e de suas repercussões. Foram utilizados 16 animais divididos em quatro grupos experimentais. A metodologia de PCR em tempo real foi realizada para analisar a expressão do microRNA-27b. Não observamos diferenças estatísticas significativas em sua expressão.

Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio de levantamento realizado em 2016, os acidentes vasculares cerebrais (AVC) são a segunda principal causa de morte e a terceira principal causa de incapacidade no mundo. Entre esses acidentes, a partir de estudos feitos pela Sociedade Brasileira de Neurologia (SBN) em 2000, a isquemia cerebral representa uma das principais causas de morte no Brasil. Em países mais pobres a incidência do AVC mais do que duplicou nos últimos quarenta anos, ao passo que, em países mais ricos, no mesmo período, houve uma diminuição de cerca de 42% (FEIGIN et al., 2010). A isquemia é caracterizada, de acordo com Wanchao et al. (2018), pela interrupção do fluxo sanguíneo cerebral e consequente privação, ao tecido, de oxigênio e glicose, necessários para o metabolismo celular.

Conforme Shamsaei et al. (2015), após o AVC, ocorre edema cerebral, uma das causas mais relevantes e responsáveis pela morte neuronal, assim como pelo desenvolvimento das lesões cerebrais. Entretanto, é relevante que se tomem medidas práticas não somente para impedir o desenvolvimento de lesões e edema cerebral, mas também para contenção dos prejuízos neurológicos subsequentes. Neste contexto, estudos recentes investigam o papel da prática de exercício físico associado a doenças cerebrovasculares. Atualmente, algumas abordagens terapêuticas que utilizam o exercício físico estão sendo estudadas com o foco na reabilitação em modelos de isquemia cerebral experimental. A prática de exercícios

físicos regulares possui uma grande proporção na melhora da qualidade de vida e tem sido utilizada como mecanismo de neuroproteção. A integração de vários impulsos neuronais cerebrais permitem alterações plásticas que beneficiam as estruturas encefálicas comprometidas devido à lesão (GARBUZOVA-DAVIS et al., 2013).

O exercício físico é essencial na nossa rotina diária para mantermos o bem estar geral do corpo e em especial do sistema nervoso. Nas últimas décadas muitos estudos evidenciam que o exercício físico melhora as habilidades cognitivas e a falta de exercício pode levar a incidência de várias desordens neurológicas (FERNANDES, ARIDA E GOMEZ-PINILLA, 2017).

Os roedores são os principais animais utilizados em protocolos de exercício físico relacionados aos estudos das funções cerebrais e seus mecanismos nas pesquisas experimentais. (AGUIAR; PINHO, 2007). Nas situações em que o exercício físico antecede à isquemia cerebral, ele promove neuroproteção cerebral em ratos e, entre os mecanismos envolvidos, podemos destacar a diminuição da reação inflamatória, a diminuição do edema cerebral e o aumento de proteínas protetoras do tecido neuronal (DAMÁZIO et al., 2015). O maior benefício do exercício físico pré-isquêmico é a otimização da capacidade de manutenção do suprimento de energia, além de diversos outros mecanismos que permitem a contenção nos danos causados no tecido nervoso pela isquemia (DORNBOS et al., 2013). MicroRNAs são uma família de pequenos RNAs não codificantes que fazem parte de processos de regulação pós-transcricional da expressão de genes alvo (YUAN et al., 2018). Novas pesquisas têm investigado o padrão de expressão dos microRNAs nas lesões causadas pela isquemia cerebral, visto que eles, comprovadamente, participam das atividades cerebrais fisiológicas normais. A ação pós-transcricional rápida dos microRNAs e a sua capacidade de regular simultaneamente muitos genes fazem deles os promissores alvos terapêuticos (OUYANG et al., 2014). Estudos recentes destacam os microRNAs como potenciais biomarcadores cerebrais envolvidos em muitos mecanismos moleculares como proliferação, diferenciação, apoptose, plasticidade sináptica e

aquisição e perda de memória. Várias pesquisas demonstram que o exercício físico pode minimizar os efeitos das lesões cerebrais traumáticas assim como do envelhecimento através da regulação dos microRNAs. Nessa ação neuroprotetora foi observada associação da preservação das funções cognitivas, sendo que alguns microRNAs apresentam-se com níveis de expressão aumentados, como por exemplo, os miRNAs: miR-21, miR-34, 28a, miR-98a, miR-148b, miR-7a e miR-15b, e outros com níveis de expressão diminuídos: miR-105 e miR-133b (FERNANDES, ARIDA E GOMEZ-PINILLA, 2017).

Objetivos

Nossos objetivos foram avaliar a expressão do microRNA-27b, por meio de PCR em tempo real, em ratos submetidos ao modelo experimental de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média associados à realização de exercício físico pré-isquemia.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 16 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem *Wistar*, pesando entre 280 a 310 gramas, fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais.

Grupo Controle: foi constituído por quatro animais que após a anestesia e a estabilização das variáveis biológicas, foram submetidos à eutanásia sem a realização do procedimento cirúrgico;

Grupo Exercício Físico: foi constituído por quatro animais que, após os treinamentos físicos pelo período de quatro semanas, foram submetidos à eutanásia sem a realização do procedimento cirúrgico;

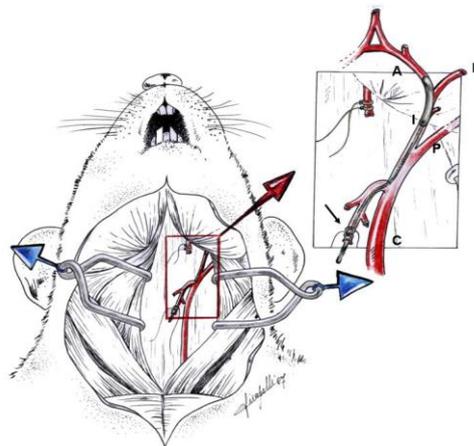
Grupo Isquemia Cerebral: foi constituído por quatro animais submetidos à isquemia focal por oclusão da artéria cerebral média durante 60 minutos, seguido por reperfusão de 24 horas, e, posteriormente, foram submetidos à eutanásia;

Grupo Exercício Físico + Isquemia cerebral: foi constituído por quatro animais que após a realização dos treinamentos físicos pelo período de quatro semanas, foram submetidos à isquemia focal por oclusão da artéria cerebral média durante 60 minutos, seguido por reperfusão de 24 horas e, posteriormente, submetidos à eutanásia.

Procedimentos Gerais

Os procedimentos gerais básicos foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia Experimental do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, seguindo-se os passos técnicos descritos no trabalho de Carlotti Jr, Colli e Kazuo (2001).

Figura 1 – Desenho ilustrando o procedimento de oclusão da origem da artéria cerebral média no rato em experimento



Fonte: (TIRAPELLI, 2007 – COM PERMISSÃO).

Programa de Exercício Físico em Esteira

Os animais passaram por um período de aclimação por cinco dias com velocidades (5 a 18m/min) e durações (5 a 15 min) progressivas. O objetivo do período de adaptação foi reduzir os níveis de estresse apresentados durante a manipulação e a utilização da esteira (MANCHADO et al., 2006). O protocolo é composto por um período total de quatro semanas. O aquecimento consiste em 2 min a velocidade de 5 m/min e esta foi gradativamente aumentada até atingir a velocidade de 18 m/min em que os animais ficaram por 30 minutos sempre com 0° de inclinação. (FERREIRA et al., 2007; STRADECKI-COHAN, 2017).

Identificação do microRNA

Foram utilizados, para indentificação e escolha do microRNA alvo, os softwares e as bases de dados *Diana Tools*, *TargetScan* e *miRWalk*. Um conjunto de microRNAs foram identificados como diferencialmente expressos e relacionados aos seus potenciais transcritos-alvo. Dentre os microRNAs identificados, o microRNA-27b foi escolhido.

Análise da Expressão do microRNA

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial do microRNA. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a

utilização do reagente *TaqMan Master Mix* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o sistema disponível comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, composto por oligonucleotídeos e sondas (*Applied Biosystems*) para a análise quantitativa da expressão do microRNA. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de ΔCT . O software *GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA*) foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística. Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho *7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

Análise Estatística

Para a avaliação da expressão do microRNA-27b a análise estatística foi realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunns*. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism version 8.00 for Windows*, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*), sendo considerado estatisticamente significante valores de $p < 0.05$.

Resultados e Discussão

O gráfico representa a média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-27b entre os grupos estudados. Em nosso trabalho não observamos diferenças significativas nos níveis de expressão do microRNA-27b entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p > 0.05$, *Kruskal Wallis test*), permitindo-nos sugerir que as condições do desenho experimental como, por exemplo, a duração do período de isquemia assim como o tempo de reperfusão, podem estar diretamente associadas ao padrão de expressão do microRNA-27b.

É importante ressaltar que estudos com associação entre a expressão do microRNA-27b em isquemia cerebral e exercício físico são escassos. Entretanto, pesquisas recentes demonstram que o microRNA-27b promove, por regulação negativa, a recuperação após acidente vascular cerebral (AVC) através de estímulo da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK). (YUAN et al., 2018). Além disso, um estudo realizado por Wang et al. (2019), que seguiu a mesma linha de pesquisa de associação entre o microRNA-27b e AMPK, demonstrou que em um modelo de oclusão da artéria cerebral média do rato, a administração de inibidor de microRNA-27b melhorou significativamente a recuperação da sua função comportamental e da sua memória espacial.

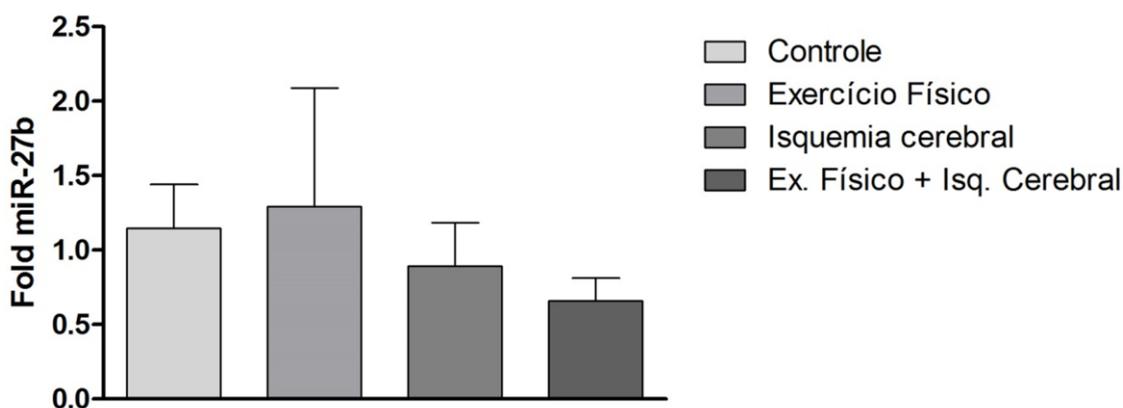
Shin et al. (2014) realizou uma pesquisa em que foram coletados dados que demonstraram que os sinais induzidos por tecido isquêmico do cérebro aumentam a expressão do fator 1 derivado de células estromais (SDF-1) através da via do microRNA-27b em células de astrocitoma C6 e astrócitos primários. Ou seja, a expressão aumentada de SDF-1 por insultos isquêmicos por meio da expressão do microRNA-27b é um possível mecanismo subjacente à aplicação terapêutica do pré-condicionamento isquêmico.

Dessa forma, novos estudos são necessários para elucidar a interação entre a fisiopatologia da isquemia cerebral associada ao exercício físico. Outros microRNAs necessitam ser avaliados e com diferentes tempos de duração da isquemia cerebral assim como em diferentes períodos de reperfusão.

Conclusão

Em nosso estudo não observamos diferenças significativas na expressão do miRNA-27b no tecido cerebral (foco isquêmico) entre os grupos estudados: controle, isquemia cerebral, exercício físico e isquemia cerebral associada ao exercício físico.

Gráfico – Média dos valores da expressão do microRNA-27b



Fonte: Elaboração própria (software *GraphPad Prism*® versão 8.00).

Referências

AGUIAR A.S., PINHO R.A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2007.

CARLOTTI JR CG, COLLI BO, KAZUO JY. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial, **Arquivos Neuropsiquiatria**. v. 59, p. 365-371, 2001.

DAMÁZIO LCM, MELO RTR, LIMA MC, PEREIRA VG, RIBEIRO RIMA, ALVES NR, MONTEIRO BS, NATALI AJ, DEL CARLO RJ, COSTA MALDONADO IRSC. Physical exercise promotes neuroprotection structural and functional in rats with cerebral ischemia. **Revista Neurociências**, v. 23, n. 4, p. 581–588, 2015.

DORNBOS D 3RD, ZWAGERMAN N, GUO M, DING JY, PENG C, ESMAIL F, SIKHARAM C, GENG X, GUTHIKONDA M, DING Y. Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury. **J Neurosci Res**. 2013.

FEIGIN VL, FOROUZANFAR MH, KRISHNAMURTHI R, MENSAH GA, CONNOR M, BENNETT DA. Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. **Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study**, 2010.

FERNANDES, J.; ARIDA, R.M.; GOMEZ-PINILLA, F. Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**. 2017 Sep;80:443-456.

FERREIRA JC, ROLIM NP, BARTHOLOMEU et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**. v.34: 760–765, 2007.

GARBUZOVA-DAVIS S, RODRIGUES COM, HERNANDEZ-ONTIVEROS DG, TAJIRI N, FRISINA-DEYO A, BOFFELI SM, ABRAHAM JV, PABON M, WAGNER A, ISHIKAWA H, SHINOZUKA K, HALLER E, SANBERG PR, KANEKO Y, BORLONGAN CV. Blood-Brain Barrier Alterations Provide Evidence of Subacute Diaschisis in an Ischemic Stroke Rat Model. **PLoS ONE**. v. 8, n. 5, 2013.

MANCHADO, F.B.; GOBATO, C.A.; CONTARTEZE, R.V,L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady in running rats. **JEP Online**;8:4-11.2005.

OUYANG, Y.B.; XU, L.; YUE, S.; LIU, S.; GIFFARD, R.G. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. **Neurosci Lett**. 565, 53- 58. 2014.

SHAMSAEI N, ERFANI E, FERREIDONI M, SHAHBAZI A. Exercise preconditioning exhibits neuroprotective effects on hippocampal CA1 neuronal damage after cerebral ischemia. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 8, p. 1245–1250, 2015.

STRADECKI-COHAN HM, YUBI M, COHAN CH, SAUL I, GARVIN AA; PEREZ E; DAVE KR, WRIGHT, CB, SACCO RL, PEREZ-PINZON, MA. Physical Exercise Improves Cognitive Outcomes in 2 Models of Transient Cerebral Ischemia. **Stroke**. 48:00-00.2017

TIRAPELLI, D.P.C. Expressão gênica da apoptose celular na isquemia cerebral focal em ratos e a ação neuroprotetora da hipotermia e do cetoprofeno. **Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, 2007.

WANCHAOS S, CHEN M, ZHIGUO S, FUTANG X, MENG M. Protective effect and mechanism of Lactobacillus on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 51, n. 7, e7172, 2018.

Wang Z, Yuan Y, Zhang Z, Ding K. Inhibition of miRNA-27b enhances neurogenesis via AMPK activation in a mouse ischemic stroke model. **FEBS Open Bio**. 2019.

Yuan Y, Zhang Z, Wang Z, Liu J. MiRNA-27b Regulates Angiogenesis by Targeting AMPK in Mouse Ischemic Stroke Model. **Neuroscience**, 2018.

Shin JH, Park YM, Kim DH, et al. Ischemic brain extract increases SDF-1 expression in astrocytes through the CXCR2/miR-223/miR-27b pathway. **Biochim Biophys Acta**, 2014.