



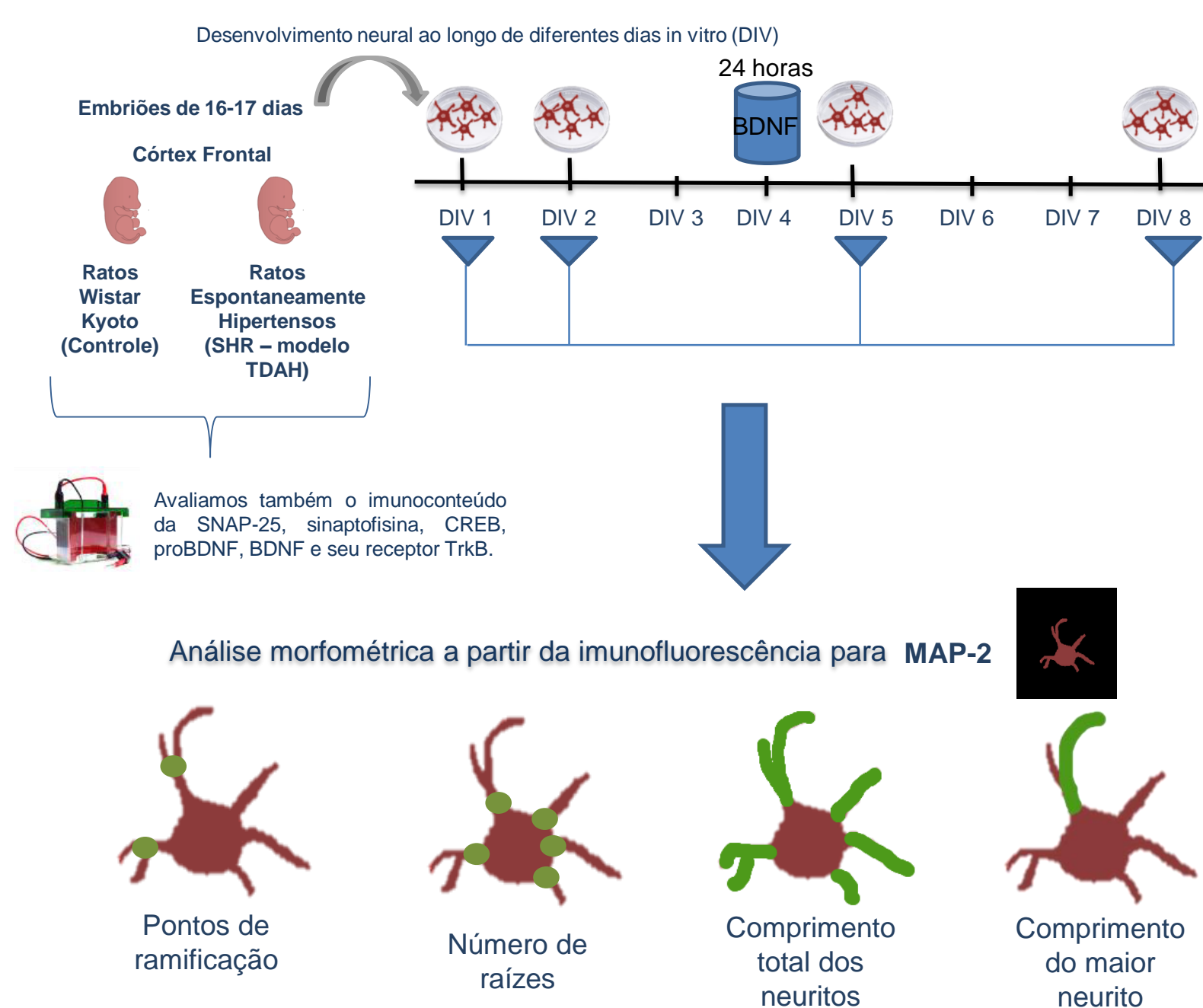
Atraso no desenvolvimento neuronal e alterações em proteínas sinápticas em cultura de neurônios corticais de um modelo animal do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Gabriel Carvalho da Silva, Lisiane de Oliveira Porciúncula

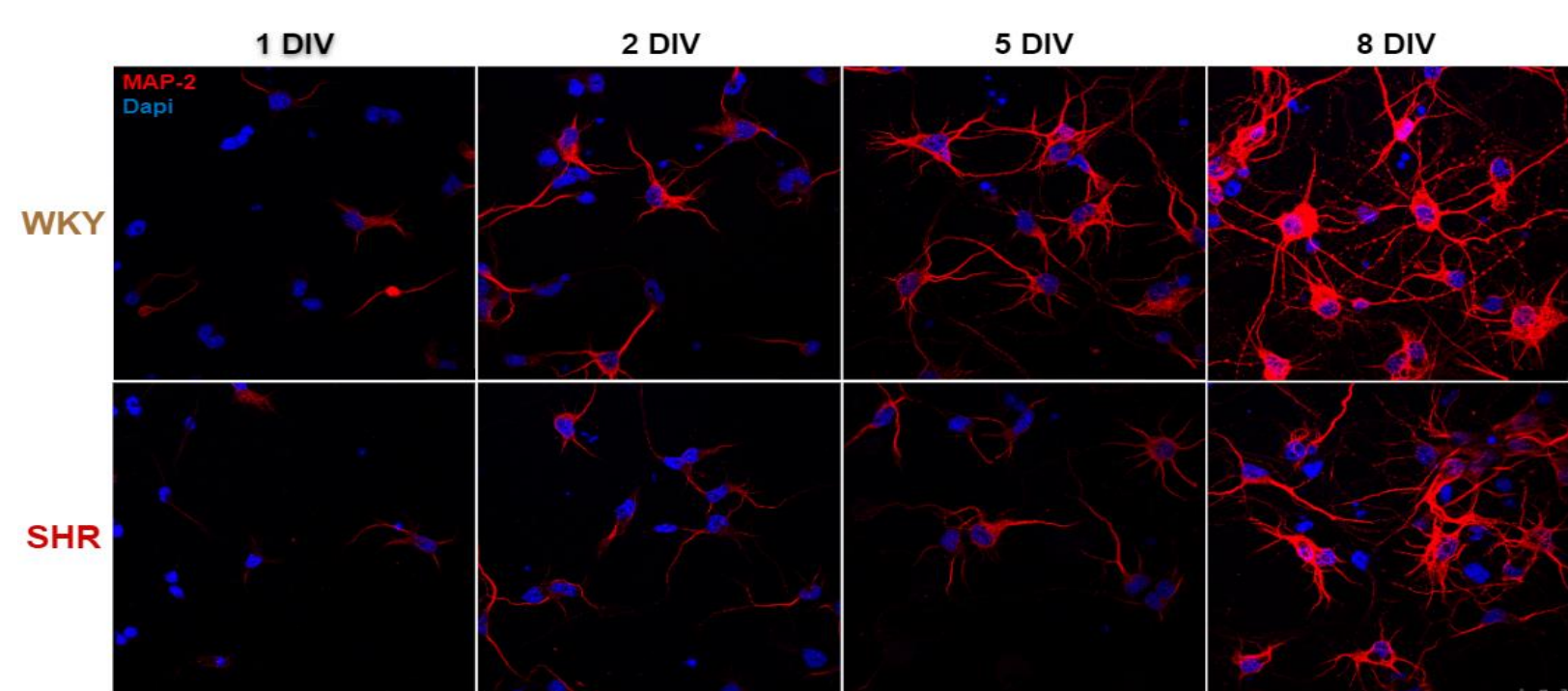
Introdução e objetivo

Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos do desenvolvimento mais comuns, caracterizado pelos sintomas de inatenção, hiperatividade e impulsividade. A etiologia do TDAH ainda não foi totalmente esclarecida, mas polimorfismos em genes que codificam o transportador de dopamina (DAT), a proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma (SNAP-25), e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) já foram reportados. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são considerados o modelo animal mais validado para estudos sobre o TDAH. Embora muitos estudos comportamentais sejam realizados com estes animais, há escassa literatura com estudos a nível celular. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o desenvolvimento *in vitro* de neurônios isolados a partir do córtex frontal de ratos SHR e Wistar-Kyoto (WKY, cepa controle).

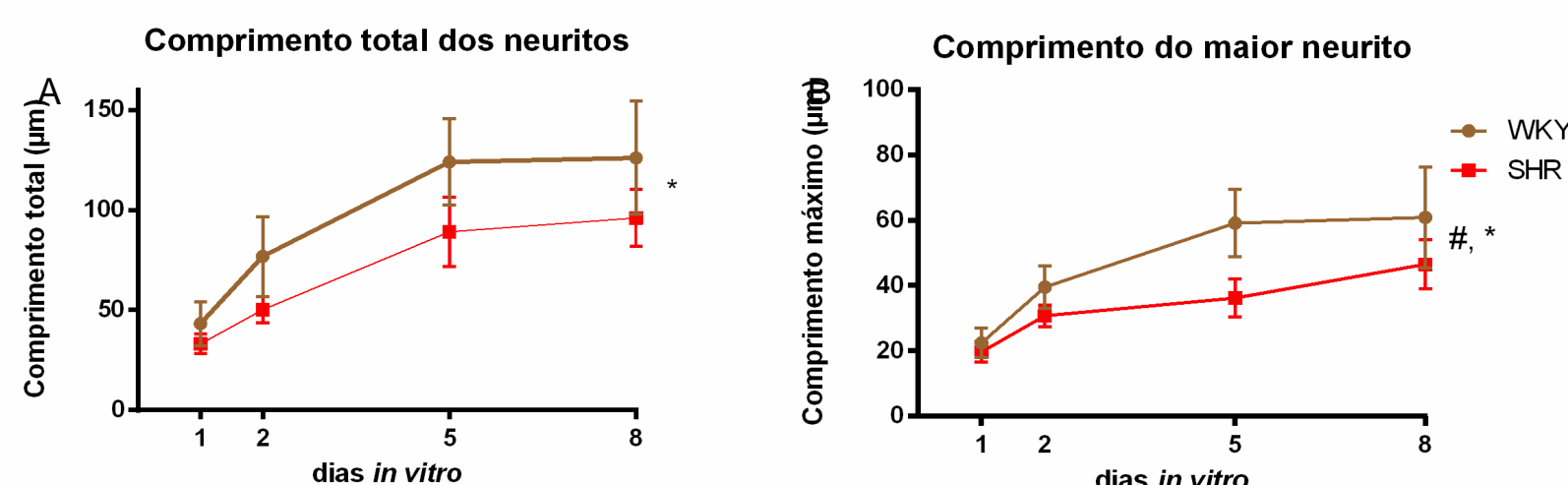
Materiais e Métodos



Resultados

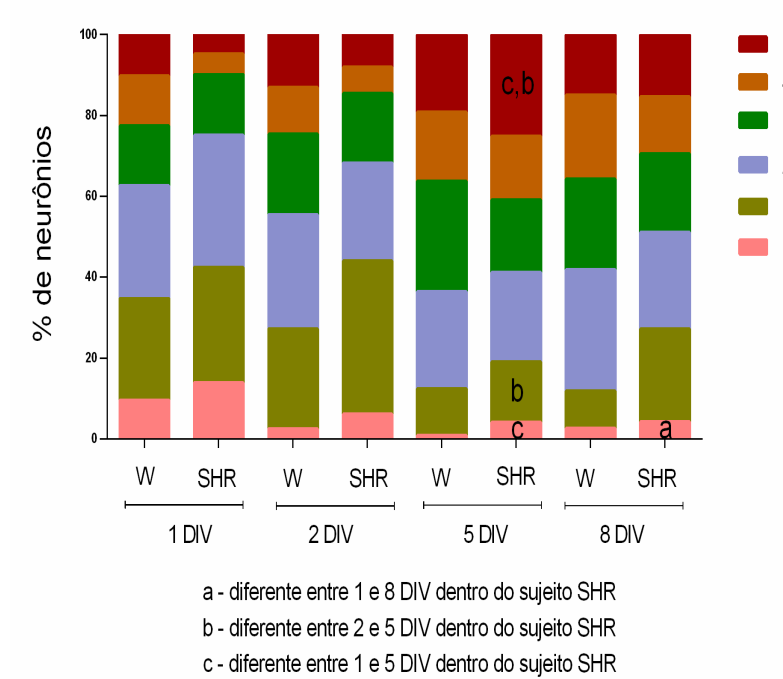


Painel representativo da análise morfométrica dos neurônios corticais frontais. A morfologia neuronal em 1, 2, 5 e 8 DIV de ambas as linhagens foi avaliada por imunofluorescência do marcador somatodendrítico MAP-2 (vermelho) e os núcleos são visualizados por coloração com DAPI (azul). Barra de escala = 20µm.



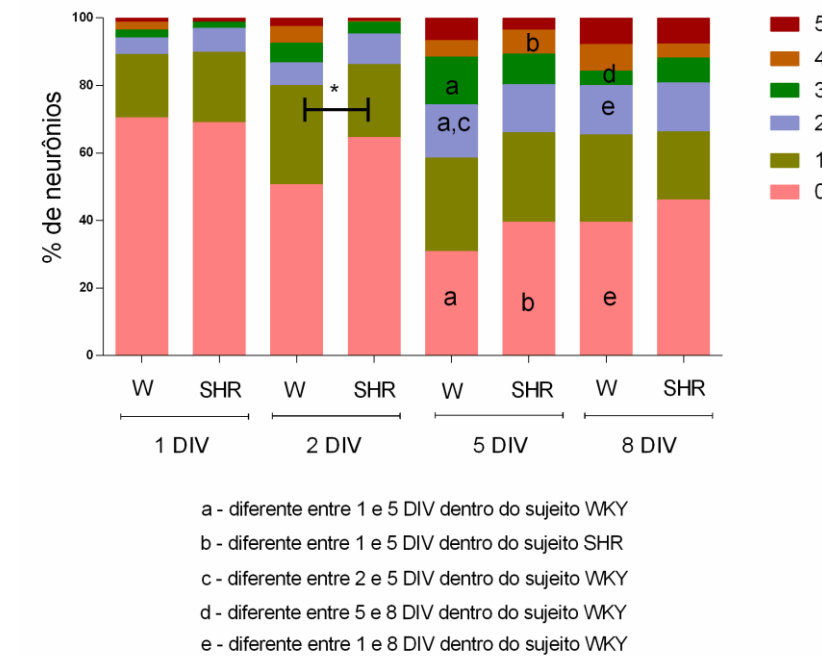
Análise morfométrica dos neurônios corticais frontais por imunofluorescência com MAP-2 durante diferentes dias *in vitro* (DIV): 1, 2, 5 and 8 DIV. Os seguintes parâmetros foram avaliados: A) Comprimento total dos neuritos em micrômetros (µm); B) Comprimento do maior neurito (µm). Dados expressos como a média de 5 culturas independentes (cerca de 50 neurônios por condição). ANOVA de duas vias com medidas repetidas: * P<0,05; # interação

Raízes



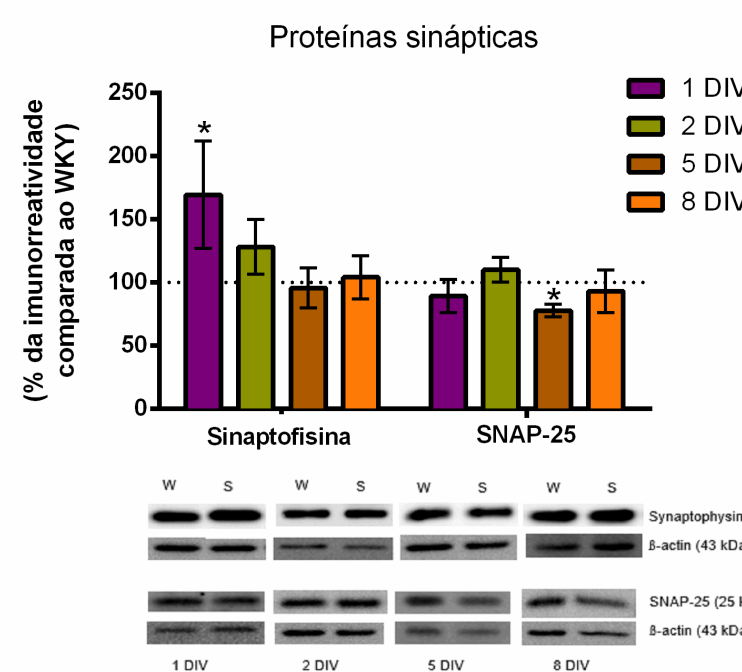
Porcentagem de neurônios corticais de ratos WKY e SHR exibindo 0,2,3,4 ou 5+ raízes durante os diferentes dias *in vitro* (DIV). ANOVA de duas vias para medidas repetidas com correção de Tukey.

Pontos de ramificação



Porcentagem de neurônios corticais de ratos WKY e SHR exibindo 0,2,3,4 ou 5+ pontos de ramificação durante os diferentes dias *in vitro* (DIV). ANOVA de duas vias para medidas repetidas com correção de Tukey: *P<0,05

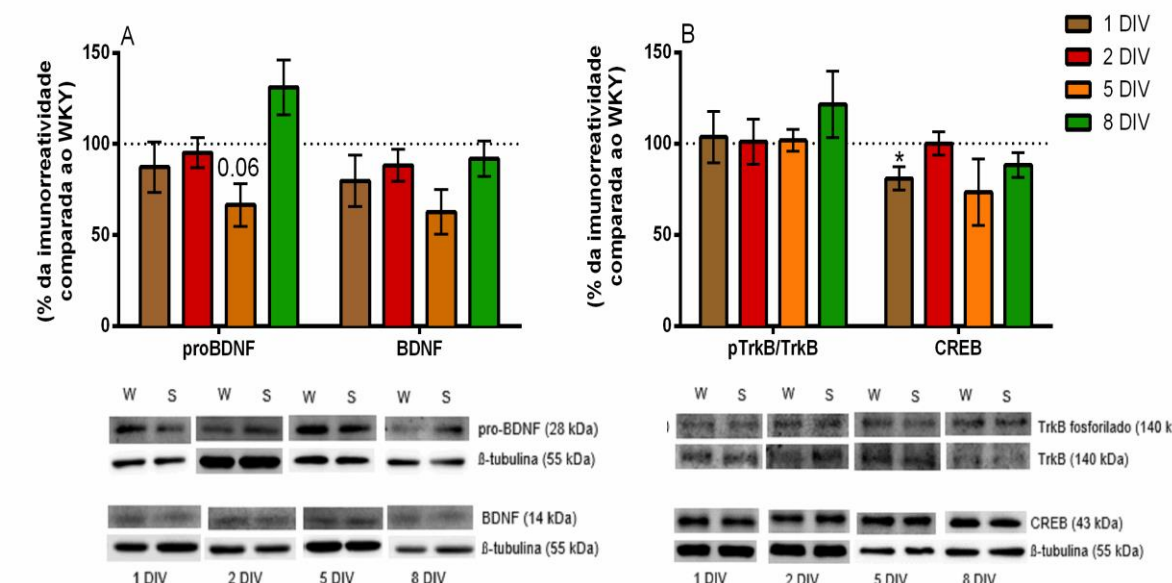
Neurônios SHR



Imunoconteúdo da sinaptofisina e SNAP-25 na cultura neuronal primária de ratos SHR durante os diferentes dias *in vitro* (DIV). Dados representados como média ± S.E.M (n = 6-8 culturas diferentes) da % da imunoreatividade em relação ao controle. Teste de Wilcoxon: * P < 0,05.

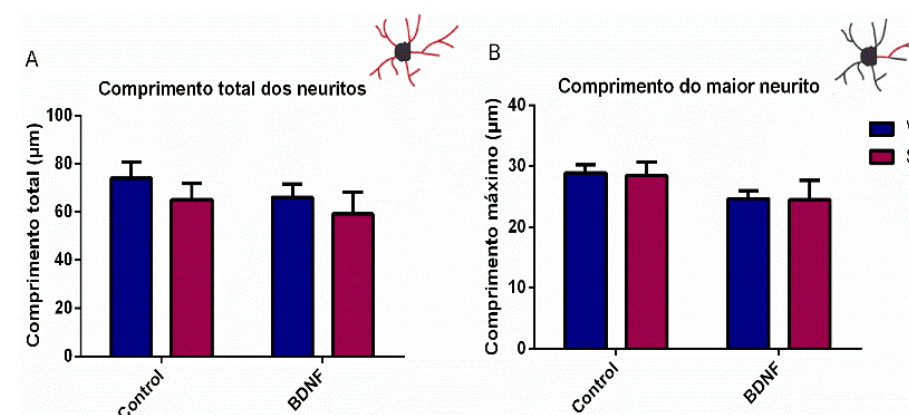
Neurônios SHR

BDNF e proteínas relacionadas



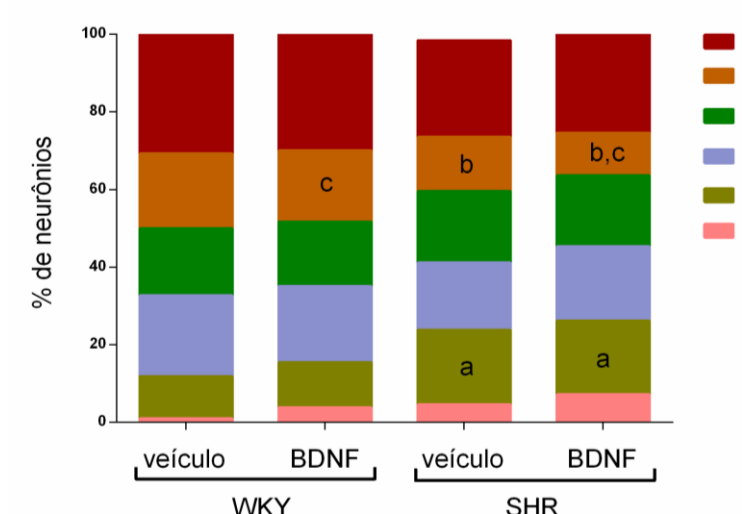
Imunoconteúdo do proBDNF, BDNF, pTrkB/TrkB e CREB na cultura neuronal primária de ratos SHR durante os diferentes dias *in vitro* (DIV). Dados representados como média ± S.E.M (n = 6-9 culturas diferentes) da % da imunoreatividade em relação ao controle. Teste de Wilcoxon: * P < 0,05

Tratamento com BDNF no 5 DIV (24h)



Análise morfométrica de neurônios corticais de ratos WKY e SHR em 5 DIV. Os neurônios foram analisados pela imunofluorescência da MAP-2 após 24h de tratamento com BDNF (20 ng/mL). Dados expressos como média ± S.E.M (n=5 culturas independentes, média de 50 neurônios por condição). ANOVA de duas vias.

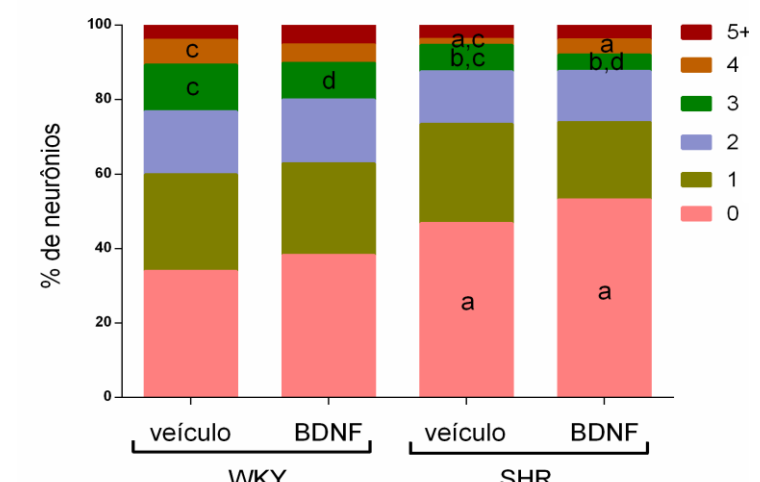
Raízes



a - diferença entre WKY e SHR, sendo P < 0,05
b - diferença entre WKY e SHR, sendo P < 0,01
c - diferença no BDNF entre as cepas, sendo P < 0,05

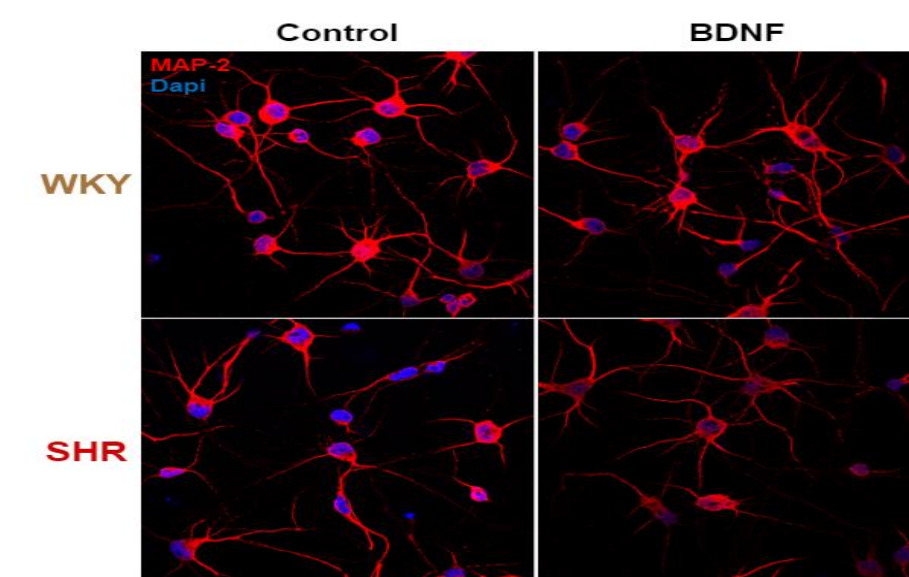
Porcentagem de neurônios corticais de ratos WKY e SHR exibindo 0, 1, 2, 3, 4 ou 5+ raízes em 5 DIV após 24h de tratamento com BDNF (20 ng/mL). ANOVA de duas vias para medidas repetidas com correção de Bonferroni.

Pontos de ramificação



a - diferença entre WKY e SHR, sendo P < 0,05
b - diferença entre WKY e SHR, sendo P < 0,001
c - diferença no veiculo entre as cepas, sendo P < 0,05
d - diferença no BDNF entre as cepas, sendo P < 0,05

Porcentagem de neurônios corticais de ratos WKY e SHR exibindo 0, 1, 2, 3, 4 ou 5+ pontos de ramificação em 5 DIV após 24h de tratamento com BDNF (20 ng/mL). ANOVA de duas vias para medidas repetidas com correção de Bonferroni.



Painel representativo da análise morfométrica dos neurônios corticais após 24h de tratamento com BDNF (20 ng/mL). A morfologia neuronal em 5 DIV de ambas as linhagens foi avaliada por imunofluorescência do marcador dendrítico MAP-2 (vermelho) e os núcleos são visualizados por coloração com DAPI (azul). Barra de escala = 20µm

Considerações finais

Nossos achados corroboram estudos de neuroimagem em pacientes com TDAH, pois revelam que os neurônios do modelo animal apresentam atraso no seu desenvolvimento e maturação. Este atraso se refletiu no imunoconteúdo de proteínas importantes para o funcionamento das sinapses e não foi associado a modificações no BDNF. Essas alterações na arborização dendrítica no modelo do TDAH podem contribuir para compreender as bases neurobiológicas do TDAH e servir como ferramentas para futuros estudos sobre estratégias farmacológicas para o tratamento deste transtorno do desenvolvimento.