

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE FÍSICO E PSICOLÓGICO SOBRE O PLEXO CARDÍACO DE RATOS NA FASE JUVENIL

Vivian Fuguhara de Lima (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Silvana Regina de Melo (Coorientadora) e Carmem Patrícia Barbosa (Orientadora), e-mail: vivian_fuguhara@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas

Subárea: Morfologia

Palavras-chave: Neurônios do coração, exaustão física e psicológica, modelo experimental de estresse.

Resumo

Estresse é uma resposta não específica do organismo a condições adversas, podendo, quando aplicado de maneira constante na infância, gerar consequências graves e duradouras. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse físico e psicológico aplicado na fase juvenil do desenvolvimento sobre o plexo cardíaco de ratos machos da linhagem Wistar. Os animais foram distribuídos em três grupos: Controle (GC; n=3), Estresse Físico (EF; n=2) e Estresse Psicológico (EP; n=4). Os procedimentos de estresse foram aplicados durante três dias consecutivos a partir dos 25 dias de vida pós-natal. A eutanásia foi realizada aos 64 dias de idade e os corações coletados, fixados e processados histologicamente. Cortes de 5 µm foram corados pelas técnicas de Giemsa, Hematoxilina-Eosina e Picrossirius a fim de que análises morfométricas, morfológicas e quantitativas dos neurônios e de fibras colágenas associadas ao plexo cardíaco fossem realizadas. Os resultados demonstraram que o estresse físico causou diminuição da área neuronal e os dois modelos experimentais de estresse predisuseram deposição de fibras colágenas do tipo I no plexo cardíaco.

Introdução

O estresse é uma resposta inespecífica do organismo a condições adversas. Quando o sistema de resposta ao estresse é ativado, há uma descarga adrenérgica concomitante ao aumento da frequência cardíaca e dos níveis de hormônios relacionados ao estresse como, por exemplo, o cortisol. Caso uma criança tenha a ativação constante da resposta ao estresse, os sistemas corpóreos em desenvolvimento poderão ser afetados, impactando seu comportamento e aprendizado devido alterações morfológicas e funcionais (SHONKOFF e GARNER, 2012). Isto porque o estresse pode gerar uma condição biológica desfavorável caracterizada pelo desequilíbrio entre a formação e a remoção de agentes oxidantes no organismo, causando danos aos mais variados tipos de tecidos. Tal condição, conhecida como estresse oxidativo, é especialmente danosa ao tecido nervoso o qual é particularmente sensível à formação de espécies reativas (DOBROVOLNY, SMRCHKA e BIENERTOVA-VASKU, 2018). Nesse contexto, um importante grupo de neurônios e células da glia localizados no coração (chamados em conjunto de plexo cardíaco) tem se destacado e sido atualmente apontado como coadjuvante na

modulação da atividade cardíaca (BRACK, 2015). Por isso este estudo teve como objetivo analisar os efeitos do estresse físico e psicológico sobre aspectos morfométricos e quantitativos do plexo cardíaco de ratos na fase juvenil.

Materiais e métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEM, sob o parecer número 4993050617, datado de 08/08/2017.

Delineamento Experimental

Foram utilizados 9 ratos machos da linhagem Wistar distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: Grupo Controle (GC; n=3), Estresse Físico (EF; n=2) e Estresse Psicológico (EP; n=4). Os procedimentos de estresse foram executados por três dias consecutivos a partir do 25º dia de vida pós-natal. Animais do grupo EF foram imobilizados durante três sessões de 30 minutos com intervalos de 15 minutos entre as mesmas (Brydges et al., 2012). Animais do grupo EP foram expostos ao predador (gato) durante duas sessões de 10 minutos com intervalo de 5 minutos entre elas (Blanchard et al., 1998, 2003).

Coleta e processamento histológico

Aos 64 dias de vida pós-natal, os animais foram eutanasiados e submetidos à toracotomia para remoção cirúrgica do coração. Os órgãos foram então fixados e submetidos à rotina histológica, sendo realizados cortes transversais semi-seriados de 5 µm os quais foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE), Picrossirius e Giemsa.

Análise do plexo cardíaco

Para análise quantitativa e morfométrica do plexo cardíaco foram utilizadas as lâminas coradas pelas técnicas de HE e de Giemsa, as quais foram visualizadas em um microscópio óptico (MOTIC®) equipado com câmera de vídeo associada a um sistema computadorizado de análise de imagem (Image Pró-Plus 4.0). A análise quantitativa dos neurônios dos gânglios do plexo cardíaco foi realizada por amostragem, sendo contados 40 campos microscópios de cada animal na objetiva de 20X. A análise morfométrica foi realizada por meio da mensuração da área do corpo celular de 100 neurônios do plexo cardíaco de cada animal na objetiva de 20X. Para a análise das fibras colágenas do plexo cardíaco foram utilizadas as lâminas coradas pela técnica de Picrossirius a diferenciando a birrefringência e a organização das fibras colágenas do tipo I, tipo III e totais da matriz extracelular associada ao plexo cardíaco. Para tanto, foi utilizado um microscópio de luz comum e de luz polarizada (MOTIC®) na objetiva de 40X.

Análise estatística

Os grupos foram comparados pela análise de variância (ANOVA). O nível de significância foi de 5%. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas usando o programa *GraphPad Prism*® versão 5.0.

Resultados e Discussão

Os gânglios cardíacos foram nitidamente visualizados e analisados em todos os grupos, mostrando-se próximos aos vasos da base do coração e a outros vasos sanguíneos menores. Também foi observada a presença de tecido adiposo unilocular e miocárdio ao redor dos mesmos. Ademais, os gânglios apresentaram dimensões e formatos variados.

Os resultados mostraram diminuição da área do neurônio no grupo EF quando comparado aos grupos controle e de estresse psicológico. Houve também aumento das fibras colágenas do tipo I associadas ao plexo cardíaco nos grupos EP e EF em relação ao grupo controle. As demais análises realizadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados (Tabela 1)

Tabela 1. Média±Desvio padrão de morfometria neuronal, número de neurônios e fibras colágenas dos tipos I, III e totais associadas ao plexo cardíaco nos grupos GC, EP e EF. * indica significância estatística com $p < 0,05$.

VARIÁVEIS	GRUPOS	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
Morfometria neuronal (μ^2)	GC	659,0 ± 28,7
	EP	572,3 ± 48,5
	EF	530,3 ± 0,9*
Nº de neurônios/campo (n)	GC	11,99 ± 0,89
	EP	8,83 ± 1,60
	EF	10,36 ± 3,77
Fibras colágenas tipo I (μ^2)	GC	8,67 ± 1,17
	EP	12,30 ± 1,39*
	EF	12,86 ± 1,11*
Fibras colágenas tipo III (μ^2)	GC	3,83 ± 0,51
	EP	3,76 ± 0,64
	EF	2,43 ± 0,08
Fibras colágenas totais (μ^2)	GC	39,82 ± 4,70
	EP	42,50 ± 7,05
	EF	45,24 ± 10,42

A diminuição da área do neurônio no grupo EF condiz com os resultados obtidos por Smirnov, Pisarev e Samusev (2006) os quais constataram que o estresse por imobilização aplicado por 3, 7, 15 e 30 dias modificou o plexo cardíaco e o núcleo ambíguo da medula de ratos em crescimento, causando diminuição no volume do corpo neuronal e no volume médio do núcleo dos neurônios. Rorabaugh et al. (2019) verificaram que o estresse crônico por exposição ao predador pode induzir lesões miocárdicas caracterizadas por deposição de colágeno, necrose e infiltração de células mononucleares. Além disso, associa-se a mudanças indicativas de remodelação cardíaca, tais como alterações na expressão gênica e na estrutura do tecido.

Ademais, a inalteração apresentada nas demais variáveis deste estudo pode estar relacionada ao fato de que o estresse pode gerar três tipos de respostas diferentes dependendo da duração, da aplicação e da fase do desenvolvimento da vida na qual o indivíduo foi submetido ao estresse. Assim, respostas positiva ou tolerável podem ocorrer se o estresse for aplicado de maneira aguda. No entanto, na resposta positiva ocorrem pequenas mudanças momentâneas na frequência cardíaca e nos

níveis hormonais, enquanto que na resposta tolerável há ativação dos sistemas de resposta ao estresse em maior grau, sendo associada a eventos mais severos e duradouros. De maneira mais comprometedora, pode haver uma resposta tóxica se o estresse for aplicado cronicamente. Neste caso, as adversidades são mais intensas e persistentes, e podem gerar consequências severas como, por exemplo, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor quando os estímulos estressores são aplicados precocemente (SHONKOFF e GARNER, 2012). Outro fator que pode ter colaborado para a não diferença significativa de alguns aspectos aqui analisados é a capacidade de recuperação dos animais. Um estudo de Saber et al. (2018) demonstrou que animais submetidos ao estresse por imobilização tiveram maior perda de peso quando ele foi aplicado de maneira crônica. Inclusive, animais que não foram imediatamente eutanasiados após as sessões de estresse, mas receberam cuidados de rotina por mais cinco dias consecutivos, apresentaram recuperação completa do peso corporal. Assim, mais pesquisas são necessárias a fim de ampliar o conhecimento acerca dos diferentes modelos experimentais de estresse e suas correlações com o plexo cardíaco.

Conclusões

O estresse físico por imobilização provocou diminuição da área neuronal no grupo EF. Ademais, os dois modelos experimentais de estresse predispueram deposição de fibras colágenas do tipo I no plexo cardíaco.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo oferecimento da bolsa e ao Departamento de Ciências Morfológicas.

Referências

BRACK, K.E. The hearts 'little brain' controlling cardiac function in the rabbit. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 4, p. 348-353, 2015.

DOBROVOLNY, J.; SMRCKA, M.; BIENERTOVA-VASKU, J. Therapeutic potential of vitamin E and its derivatives in traumatic brain injury-associated dementia. **Neurological Sciences**, v. 39, n. 6, p. 989–998, 2018.

SABER, E.A., ALEEM, M.M.A.E., AZIZ, N.M., IBRAHIM, R.A. Physiological and structural changes of the lung tissue in male albino rat exposed to immobilization stress. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, 2018.

SHONKOFF, J.P., GARNER, A.S. The Lifelong Effects of Early Childhood Adversity and Toxic Stress. **Pediatrics**, v. 129, n. 1, p. e232-e246, 2012. Disponível em: < <https://pediatrics.aappublications.org/content/129/1/e232.long>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

SMIRNOV, A.V., PIISAREV, V.B., SAMUSEV, R.P. Structural Changes in the Nucleus Ambiguus of the Medulla Oblongata and Intracardiac Ganglia in Growing Rats in Immobilization Stress. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 36, n. 3, p. 279-282, 2006.