

ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROANATÔMICO DOS EFEITOS TARDIOS DO ESTRESSE EM RATOS NA FASE JUVENIL-AVALIAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRESSE FÍSICO.

Isabela Vitória Abilas Tarosso (PIBIC/Uem), Silvana Regina de Melo (Orientador), e-mail: ra103451@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Morfológicas, PR.

Morfologia, histologia

Palavras-chave: hipocampo, neurodesenvolvimento, neuroanatomia.

Resumo:

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos tardios no comportamento e neuroanatomia, da exposição ao estresse (psicológico e físico) na fase infantil. Foram utilizados 42 ratos da linhagem Wistar, divididos em três grupos: Controle (C), Estresse Físico (EF-imobilização) e Estresse Psicológico (EP-medo do predador). Com 25 a 27 dias de vida, os grupos EF e EP foram submetidos ao respectivo paradigma de estresse. No EF os animais foram colocados individualmente em tubos de plástico e mantidos por 30 minutos durante 3 sessões com intervalo de 15 minutos entre cada sessão. Para o EP, animais foram colocados dentro de caixa de acrílico transparente colocada em frente a gaiola onde se encontrava um gato adulto fêmea. Os ratos permaneceram nesta caixa durante duas sessões de 10 minutos com intervalo de 5 minutos entre as sessões. Aos 61 dias de idade foram submetidos ao teste comportamental de reconhecimento de objeto, dividido em três fases diferentes, após 15 minutos, 24 e 72 horas. Após esse procedimento, os animais foram sacrificados e 21 cérebros foram submetidos ao processo de parafinação, e processados com a técnica histológica Luxol-fast blue contra-corado com violeta cresil, a fim de realizar a quantificação da área de superfície das camadas piramidais das regiões CA1, CA3 e Giro Denteado do hipocampo. Os resultados neuroanatômicos e comportamentais evidenciaram que ambos os modelos de estresse não provocaram alterações morfológicas e cognitivas. Dessa forma nossos resultados sugerem que o impacto de ambos modelos de estresse não foram tóxicos para provocar danos a longo prazo.

Introdução

Há grande interesse da comunidade científica no estudo do estresse e seus efeitos nas diversas fases do desenvolvimento, uma vez que as áreas do cérebro tais como hipocampo, corpo amigdalóide, córtex pré-frontal em resposta a estímulos estressores apresentam alterações químicas e estruturais.

Certos períodos do neurodesenvolvimento tais como infância e adolescência são mais sensíveis, com forte impacto sobre o comportamento na vida adulta (Toth, 2008). Estudos em roedores têm oferecido valiosas informações, nesses animais o período da pré-puberdade ocorre entre 21 e 34 dias quando eles são sexualmente

imaturos. No período pós-desmame, os filhotes estão mais independente, porém áreas como hipocampo são imaturas (Avital-Richter-Levin, 2005).

Algumas pesquisas mostram que o estresse nessa fase do desenvolvimento teria impactos na vida adulta (Avital and Richter-Levin, 2005; Brietzke et al., 2012). No entanto, há outros estudos que sugerem que o estresse infantil em um nível moderado não resulta em efeitos de longa duração (Ricon, Richter-Levin e Leshem, 2011; Chen et al, 2014), podendo até promover a resiliência do cérebro a eventos estressantes na vida adulta (Ricon, Richter-Levin and Leshem, 2011).

Na tentativa de explorar mais esse fenômeno que vem gerando contradições na área, essa pesquisa avaliou os efeitos tardios da exposição ao estresse moderado na fase infantil, observando seus impactos cognitivos comportamentais (memória) e neuroanatômicos (área de superfície do hipocampo). Justifica-se o interesse no hipocampo, pois ele está relacionado com as funções cognitivas complexas como memória e os estudos dos efeitos do estresse promovido nessa área pelo abuso são contraditórios.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 42 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*). Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos com 14 animais em cada grupo: Estresse Físico (EF), Estresse Psicológico (EP) e Controle (C). Todos os procedimentos foram aprovados pela CEUA/UEM (prot. 4993050617).

Modelo experimental de estresse físico e psicológico

EF: Os animais nas idades entre 25 e 27 dias foram colocados individualmente em tubo flexível de PVC (9,5 cm de diâmetro x 3,5 cm comprimento), provocando a imobilização temporária dos ratos. O procedimento foi realizado, por três dias consecutivos, em três sessões de 30 minutos cada, com intervalos de 15 minutos entre cada sessão.

EP: Os animais, nas idades entre 25 e 27 dias foram colocados individualmente em caixa de plástico transparente (50 X 20 X 30 cm), a qual foi disposta em frente à caixa (80 X 80 X 60) que continha o gato (fêmea adulta) e 100 ml de urina do gato. Cada rato foi colocado em sua respectiva câmara durante 10 minutos, em seguida foram conduzidos para sala onde permaneceram por 5 minutos, e na sequência eram colocados novamente na caixa em frente o gato por mais 10 minutos. Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos.

Teste de reconhecimento de objeto e quantificação

No teste de reconhecimento de objeto cada rato foi colocado em uma caixa aberta (70 x 70 x 50 cm). Aos 61 dias de idade realizou-se a fase de Habituação que foi repetida durante três dias consecutivos, e consistiu em colocar o animal no centro da caixa sem qualquer objeto, permitindo ao animal explorar durante 10 minutos. Após 7 dias realizou-se a segunda etapa, de Familiarização, os ratos foram colocados no centro da caixa que continha dois objetos idênticos (taças de vidro), permitindo que o animal explorasse durante 3 minutos. Após o intervalo de 15 minutos este período, foram novamente colocados na mesma caixa, contendo agora o velho objeto (taça

de vidro) e um novo objeto (bola de vidro amarela), foi denominado teste 1 (T1). 24 horas depois foi realizado novo teste (T2), onde na caixa havia o velho objeto (taça de vidro) e outro novo objeto (garrafa verde de plástico em formato de urso), onde permaneciam durante 3 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado após 72 horas (T3), o novo objeto foi um caixa de plástico quadrada.

Para quantificar o comportamento exploratório dos animais na arena, foi considerado *explorar* apenas quando o animal tocava o objeto com nariz ou quando sua cabeça estava direcionada para o objeto, e comportamentos como dar voltas em torno do objeto ou sentar no objeto foram desconsiderados. O tempo foi considerado em segundos, e quantificados por meio da seguinte fórmula: [tempo novo objeto / tempo novo objeto + tempo velho objeto]. A análise estatística empregada foi a ANOVA e Post Test de Turkey.

Processamento histológico do cérebro e quantificação do hipocampo

Na idade adulta (em média 64 dias) os animais foram sacrificados e os cérebros foram submetidos ao processo de parafinação, seccionados com 16 μm de espessura, e processados com a técnica histológica Luxol-fast blue contra-corado com violeta cresil. Após o primeiro corte coletado aleatoriamente, cada 10ª secção foi coletada. Para o hipocampo direito e esquerdo, foram consideradas a camada piramidal das regiões CA1, CA3, Giro Denteado. As imagens foram coletadas com objetiva de 40X e projetadas em monitor por sistema de vídeo microscópio Leica modelo DMRE acoplado a câmara de vídeo Kappa CF 15/5 e sobreposto a esta tela foi colocado sistema teste contendo 144 pontos, os pontos que tocaram a camada piramidal foram considerados, para determinação da área de superfície. A análise estatística empregada foi ANOVA e Post Test de Tukey.

Resultados e Discussão

Os resultados comportamentais neuroanatômicos e não mostraram nenhuma mudança significativa entre os grupos, o teste one-way ANOVA para avaliação da memória de curto prazo (T1) foi ($F_{2,39} = 4.18, p = 0.66$), enquanto que para memória de 24 horas (T2) foi ($F_{2,39} = 2.63, p = 0.08$), e para memória de 72 horas (T3) foi de ($F_{2,39} = 0.008, p = 0.99$). Já o teste one-way ANOVA para o hipocampo direito nas regiões CA1 foi ($F_{2,16} = 1.18, p = 0.33$), na região CA3 foi ($F_{2,16} = 0.26, p = 0.77$), e para GD foi de ($F_{2,16} = 0.61, p = 0.55$). Para o hipocampo esquerdo nas regiões CA1 foi ($F_{2,16} = 2.03, p = 0.16$), na região CA3 foi ($F_{2,16} = 0.83, p = 0.45$), e para GD foi de ($F_{2,16} = 0.006, p = 0.99$). Esses resultados sugerem que o estresse em nível moderado não possui efeitos a longo prazo. Outras pesquisas, apontam que o estresse moderado na infância poderia até promover a resiliência neuronal à eventos estressores na fase adulta (Ricon, Richter-Levin e Leshem, 2011).

Conclusões

Conclui-se que o estresse provocado pelos modelos utilizados nesta pesquisa, tanto EF quanto EP não foram suficientemente tóxicos para causar alterações neuroanatômicas ou comportamentais à longo prazo nos roedores. Surgindo a

hipótese que o impacto do estresse não foi tóxico, ou o tempo decorrido após o evento estressante foi restaurador.

Agradecimentos

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a realização dessa pesquisa que me trouxe diversas contribuições acadêmicas.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Silvana Regina de Melo, que têm minha eterna gratidão, por sempre acreditar em mim e sempre se dispor a esclarecer minhas dúvidas e que me acolher e ajudar nos momentos mais difíceis .

A minha família, em especial a minha querida mãe, que sempre foram meu maior apoio, me ensinaram a ter a força e determinação para terminar essa pesquisa.

Referências

Avital, A., Richter-Levin, G. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, p.163-173, 2005.

Brietzke, E. *et al.* Impact of childhood stress on psychopathology. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Porto Alegre, v. 34, p.280-288, 2012.

Chen, L. The Effects of Early-Life Predator Stress on Anxiety- and Depression-Like Behaviors of Adult Rats. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p.10, 2014.

Ricon, T.; Richter-Levin, G.; Leshem, M. Unpredictable chronic stress in juvenile or adult rats has opposite effects, respectively, promoting and impairing resilience. **Stress**, Amsterdam, 2011.

Toth, E. *et al.*, Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. **Behavioural Brain Research**. v.190, p.135-139, 2008.