

ESTRESSE JUVENIL CAUSA EFEITO DURADOURO NA ÁRVORE DENDRÍTICA DE RATOS ADULTOS.

Kathia Terumi Kato (PIBIC/FA), Vivian Fughuara de Lima, Silvana Regina de Melo (Orientador), e-mail: ra110703@uem.br

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

Ciências biológicas/morfologia

Palavras-chave: árvore dendrítica, estresse de imobilização, estresse pelo predador

Resumo:

O estresse é capaz de causar o remodelamento de neurônios localizados no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar se dois tipos de estressores, imobilização e exposição ao predador natural, eram capazes de produzir alterações duradouras na árvore dendrítica destas regiões, em ratos machos submetidos ao estresse durante a fase juvenil. As análises do peso corporal e peso do cérebro demonstraram que ambos os modelos de estresse não causaram alterações a longo prazo. E a análise morfológica demonstrou que no hipocampo não houve alterações em resposta a ambos os modelos. Entretanto, na região do CPF apenas o estresse por exposição ao predador causou redução dos dendritos. Concluímos que os dois modelos não apresentaram toxicidade para alterar a longo prazo medidas como peso, mas sob aspecto microscópico alterou diferentemente a árvore dendrítica, confirmando que as respostas são dependentes do tipo de estresse.

Introdução

O estresse é uma resposta que pode acarretar em efeitos adaptativos ou mal-adaptativos do organismo, sendo dependente do tempo e da intensidade. Ratos machos expostos ao estresse crônico de imobilização (10 dias/2h.diárias), apresentaram atrofia dos neurônios do hipocampo (Vyas *et al.*, 2002). Assim como, ratos submetidos ao estresse de imobilização (7 dias/10 min.diárias), apresentaram redução do comprimento dos dendritos apicais dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial (Brown *et al.*, 2005). Áreas como córtex pré-frontal e hipocampo são importantes nas respostas ao estresse, pois apresentam intensa neuroplasticidade diante desses estímulos, que podem ser reversíveis em animais jovens, mas não nem sempre reversíveis em animais mais velhos. Dessa maneira, o presente

estudo avaliou se dois diferentes tipos de estresse têm impactos a longo prazo e se estes são diferentes. Para testar essa hipótese, foram utilizados diferentes paradigmas de estresse no mesmo estudo, o estresse de imobilização e de exposição ao predador natural, ambos por 3 dias em ratos jovens. A morfologia da árvore dendrítica foi avaliada após um período de recuperação (fase adulta) em neurônios piramidais do córtex cingulado (Cg1) e córtex pré-límbico (PrL) (Cg3) do córtex pré-frontal medial (mPFC) bem como células granulares do giro denteado (DG) do hipocampo

Materiais e métodos

Vinte e um ratos, Wistar machos, foram alocados aleatoriamente em um dos três grupos experimentais: EF (estresse físico, $n = 7$), EP (estresse psicológico, $n = 7$) e GC (controle, $n = 7$). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local da Universidade Estadual de Maringá (autorização CEUA nº 499.305.061.7). O estresse de imobilização foi considerado para o paradigma de estresse físico. Entre os dias 25 e 27 pós-natal, os animais jovens foram posicionados em um tubo de plástico por três períodos de 30 minutos, com intervalos de 15 minutos. Este procedimento foi realizado por três dias consecutivos. O estresse pelo predador foi considerado para o paradigma de estresse psicológico. Assim como o estresse de imobilização, entre os dias 25 e 27 pós-natal, os animais jovens foram submetidos ao estresse pelo predador. Os ratos jovens foram colocados individualmente em uma caixa de plástico transparente e quadrada, com orifícios nas paredes. Adjacente, em outra caixa de malha de arame quadrada, foi colocado uma gata adulta diferente a cada dia. Este procedimento foi realizado por dois períodos de 10 minutos, separados por intervalos de 5 minutos durante 3 dias. O grupo controle não recebeu nenhum procedimento de estresse, sendo deixados sem perturbação até a perfusão após o período de estresse dos outros dois grupos. Os ratos adultos (P64) receberam overdose de solução de pentobarbital sódico o.p., os cérebros foram extraídos, processados e corados e submetidos à técnica de Golgi-Cox. Foram analisados 10 neurônios por animal, cinco de cada hemisfério, em um total de 20 animais. A análise morfométrica foi realizada por meio de microscópio (objetiva 40x) acoplado a uma câmera. A arborização dendrítica foi traçada por meio do software 3D Simple Neurite Tracer FIJI. Os dados neuroanatômicos obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, t-test, one-way ANOVA e post hoc de Tukey. Os dados apresentaram-se como média \pm erro padrão e o nível de significância para ANOVA e teste post hoc foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferenças significativas sobre o peso corporal ($F_{2,39} = 2,81$, $p = 0,0723$) nos grupos estudados, e no peso dos cérebros ($F_{2,39} = 0,30$, $p = 0,7427$). A análise do impacto do

estresse sobre a quantidade de fezes dos animais também não se alterou ($F_{2,39} = 2,83$, $p = 0,0714$). É provável que a frequência do estresse de 3 dias, a previsibilidade do estressor e a baixa intensidade de ambos os modelos de estresse, não foram suficientemente tóxicos para causar prejuízos no peso corporal e peso do cérebro, e na árvore dendrítica da região do hipocampo. Apenas a análise da árvore dendrítica do CPF mostrou significância ($F_{2,37} = 8,86$, $p = 0,0007$). Verificou-se diminuição significativa no grupo EP ($73,88 \pm 3,25 \mu\text{m}$) comparado ao GC ($89,22 \pm 2,45 \mu\text{m}$), mas não entre GC e EF ($86,76 \pm 2,46 \mu\text{m}$) (Fig. 1a). Ambos procedimentos de estresse não provocaram alterações significativas ($F_{2,37} = 2,18$, $p = 0,1278$) na árvore dendrítica na região do giro denteado do hipocampo, do grupo EF ($112,00 \pm 2,28 \mu\text{m}$) em comparação ao GC ($116,9 \pm 3,18 \mu\text{m}$) e EP ($120,20 \pm 3,13 \mu\text{m}$) em comparação ao GC (Fig. 1b).

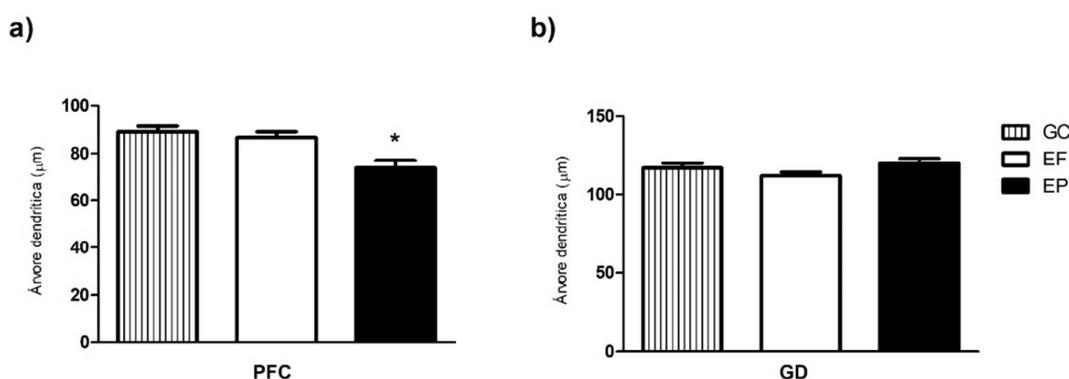


Figura 1 - A) Média \pm erro padrão do tamanho dos dendritos dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal. B) Média \pm erro padrão do tamanho dos dendritos dos neurônios piramidais do giro denteado. GC: controle (n=6); EF: estresse físico (n=7); EP: estresse psicológico (n=7). * $p < 0,05$ comparado com o GC

Ratos adultos submetidos ao estresse de imobilização (21 dias/6h/d) apresentaram atrofia dos dendritos apicais em algumas regiões do córtex pré-frontal, observados após o último dia de estresse (Perez-Cruz *et al.*, 2007). Os achados mostram que o estresse crônico de imobilização possui efeitos redutivos, entretanto no presente estudo foi utilizado um estresse com um período mais curto, o que justifica não encontrar alterações significativas. Além disso, observamos a morfologia dos neurônios após um período de recuperação e muitos estudos observam após o término do estressor. Outro estudo, mostrou ainda, que ratos submetidos ao estresse de imobilização durante 3 ou 6 semanas foram suficientes para diminuir o comprimento dos dendritos apicais de neurônios do córtex pré-frontal medial (Radley *et al.*, 2005). Entretanto, no mesmo estudo, ratos submetidos ao estresse durante 3 semanas e seguido de um período de recuperação de mesma duração, acarretou em uma semelhança entre os animais controles e aqueles estressados, sugerindo que os efeitos foram revertidos com o tempo de recuperação. Nossos resultados encontram semelhança neste estudo, que aponta para o efeito protetor do tempo de recuperação.

Adamec *et al.* (2012) demonstraram que ratos adultos (5 semanas de idade) expostos a um de dois gatos, durante 10 minutos, não apresentaram alterações nos dendritos dos neurônios do hipocampo dorsal, entretanto ratos submetidos ao estresse pelo predador e mais ansiosos, apresentaram menor densidade das espinhas dendríticas quando comparado com ratos menos ansiosos.

Conclusões

O estresse juvenil de curta frequência e intensidade não tem efeitos a longo prazo em medidas gerais, mas sob aspecto microscópico verifica-se que cada tipo de estresse exerce efeito específico. No caso do estresse de imobilização, a ausência de alterações a longo prazo pode ser positiva, uma vez que sugere que o cérebro é capaz de lidar e se adaptar de modo positivo a insultos de baixa intensidade. Ademais, a alteração específica na área pré-frontal sugere que mais estudos são necessários para compreender tais resultados.

Agradecimentos

Ao programa de iniciação científica que me proporcionou ganhar experiência e conhecimento na área.

Referências

ADAMEC, R.; HEBERT, M.; BLUNDELL, J.; MERVIS, R. F. Dendritic morphology of amygdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious handled controls. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 133-146, 2012.

BROWN, S. M.; HENNING, S.; WELLMAN, C. L. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 15, p.1714-1722, 2005.

PEREZ-CRUZ, C.; MÜLLER-KEUKER, J. I. H.; HEILBRONNER, U.; FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 1-14, 2007.

RADLEY, J. J.; ROCHER, A. B.; JANSSEN, W. G. M.; HOF, P. R.; MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. **Experimental Neurology**, v. 196, p. 199-203, 2005.

VYAS, A.; MITRA, R.; RAO, B. S. S.; CHATTARJI, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6810-6818, 2002.