

ESTRESSE JUVENIL FÍSICO E PSICOLÓGICO DE CURTA FREQUÊNCIA E INTENSIDADE NÃO CAUSA EFEITOS DURADOUROS NA MORFOLOGIA DO CORPO CALOSO DE RATOS MACHOS

Vivian Fuguhara de Lima (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Letícia Alexandrino Barilli, Kathia Terumi Kato, Silvana Regina de Melo (Orientador), e-mail: srmelo@uem.br.

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

Morfologia - Histologia

Palavras-chave: Substância branca, neuroglia, histologia.

Resumo:

O corpo caloso (CC) é constituído principalmente por fibras nervosas e células da glia, assim conectando os hemisférios cerebrais. Ele representa a principal estrutura de substância branca no cérebro de ratos e pode modificar-se estruturalmente em resposta ao estresse. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos a longo prazo do estresse juvenil sobre a espessura e quantidade de neuroglia no CC de ratos machos. Foram estudados três grupos: Grupo Controle, Estresse Físico e Estresse Psicológico, sendo que os procedimentos de estresse foram aplicados durante três dias consecutivos entre as idades de 25 dias a 27 dias de vida pós-natal. O grupo EF foi submetido à imobilização, enquanto o grupo EP foi submetido à exposição a um predador natural, gato fêmea adulto. Na idade adulta, entre 90 e 95 dias de idade, realizou-se processamento histológico do tecido cerebral, pela técnica de Klüver-Barrera, e analisou-se a espessura e quantidade de células da glia do corpo caloso. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças estatísticas nas análises realizadas. Dessa forma, conclui-se que o cérebro juvenil pode se adaptar ao estresse de curta frequência e curta intensidade, sem apresentar sequelas morfológicas duradouras na substância branca cerebral.

Introdução

O CC representa o principal componente da substância branca cerebral, sendo dividido em joelho, corpo e esplênio, tal estrutura é constituída principalmente por fibras nervosas e células da neuroglia, conectando os dois hemisférios (REYES-HARO *et al.*, 2013). A neuroglia é composta principalmente por micróglia e macroglia (astrócitos e oligodendrócitos), sendo estes dois últimos tipos os mais frequentes. Os oligodendrócitos (OL) produzem a bainha de mielina por meio do processo denominado mielinização (BRADL; LASSMANN, 2010), o qual está diretamente relacionado à maturidade destas células e, portanto, do próprio cérebro e comportamentos.

Nesse contexto, o estresse em crianças pode provocar mudanças comportamentais a curto prazo perceptíveis e alterações permanentes na estrutura e função do cérebro que aparentemente são menos visíveis (SHONKOFF; ANDREW; GARNER, 2012). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do estresse

físico e psicológico na fase juvenil de ratos sobre a espessura e a quantidade de células da glia do corpo caloso na idade adulta.

Materiais e métodos

Delineamento Experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM (parecer nº 499.305.061.7). Foram utilizados 42 ratos Wistar machos, distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (GC), Estresse Físico (EF) e Estresse Psicológico (EP). Os procedimentos de estresse foram executados por três dias consecutivos, de 25 dias de vida pós-natal a 27 dias (P25-P27). Para o EF, os animais passaram pelo modelo de imobilização, durante três sessões de 30 minutos com intervalos de 15 min. cada. Para o EP, foi aplicado o modelo de exposição ao predador (gato) em duas sessões de 10 min. com intervalo de 05 min.

Coleta e processamento histológico

Na idade adulta, P90-P95, os ratos foram anestesiados e o encéfalo de cada animal removido. Os órgãos foram fixados e submetidos a rotina histológica, obtendo-se cortes coronais semi-seriados de 16 µm corados pela técnica de Klüver-Barrera.

Análise quantitativa das células da glia

A análise foi realizada na região anterior e posterior do CC, por meio de um sistema teste de grade inserido na ocular do microscópio óptico. Assim, na objetiva de 40X foi feita a contagem dos núcleos de neuroglia dispostos no primeiro plano visual (focados), incluindo os localizados sobre as linhas externas da grade, abrangendo 5 cortes (2 campos cada corte), totalizando 10 campos/animal (Fig. 1a).

Análise da espessura do corpo caloso

A análise foi feita mediante a inserção de uma régua milimetrada na ocular do microscópio óptico e a espessura da faixa central do CC na região anterior foi mensurada na lente objetiva de 10X, considerando 5 secções por animal (Fig. 1b).

Análise estatística

A distribuição dos dados, a qual foi normal, foi verificada com o teste de *Shapiro-Wilk* (BioEstat 5.0). Assim os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e foi feita a análise de variância *One-Way* (ANOVA *One-way*) seguido do pós-teste *Tukey* para comparação entre os grupos (*GraphPad Prism* 5.0), considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Nosso estudo apontou que ambos os modelos utilizados, estresse de imobilização e exposição ao predador, não foram suficientes para provocar alterações em todos os parâmetros analisados, os quais incluem peso cerebral, peso corporal, número de células da glia na região anterior e posterior do corpo caloso e espessura do CC na região anterior (Figura 1 e Tabela 1).

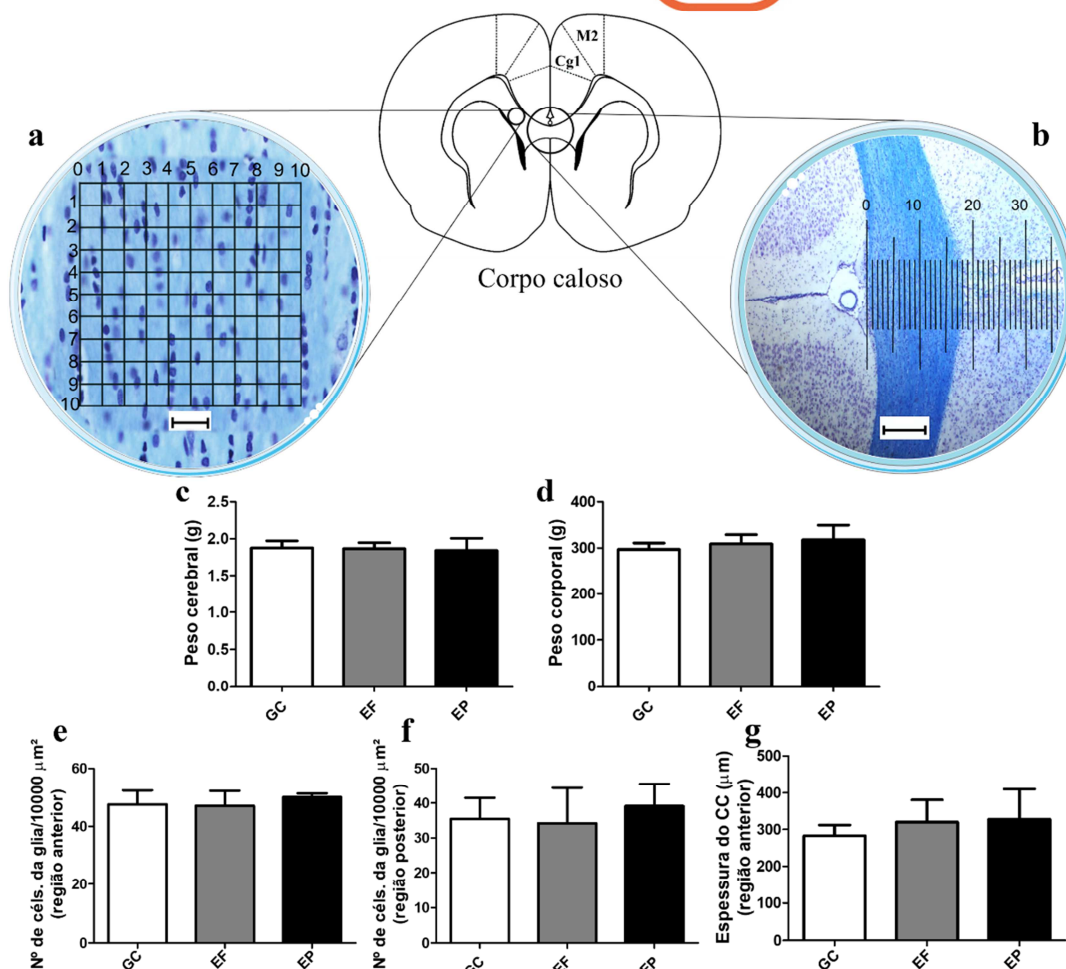


Figura 1 – Representação esquemática da metodologia utilizada para análise quantitativa de células da glia – **a**: Sistema teste 10x10 utilizado (área total = 15.625 μm²) -, e espessura do corpo caloso – **b**: régua milimetrada. Peso cerebral (**c**) e corporal (**d**) (n = 14), Nº de neuroglia em 10.000 μm² na região anterior (**e**) e posterior (**f**) do CC (n = 5) e espessura do CC (n = 6-7) (**g**). Dados expressos como média ± desvio padrão. Grupo Controle (**GC**); Estresse Físico (**EF**) e Estresse Psicológico (**EP**). Barra de escala: 20 μm (**a**); 200 μm (**b**).

Tabela 1 – Resultados das análises realizadas. Média ± desvio padrão.

Parâmetro	GC	EF	EP	F	p
Peso corporal (g)	297,20 ± 13,48	308,70 ± 20,48	318,00 ± 31,90	$F_{2,39} = 2,813$	0,723
Peso cerebral (g)	1,88 ± 0,10	1,87 ± 0,08	1,84 ± 0,16	$F_{2,39} = 0,2998$	0,7427
Nº neuroglia – RA (n/10.000 μm²)	47,64 ± 4,83	47,09 ± 5,25	50,07 ± 1,32	$F_{2,12} = 0,7178$	0,5076
Nº neuroglia – RP (n/10.000 μm²)	35,49 ± 6,06	34,24 ± 10,22	39,18 ± 6,48	$F_{2,12} = 0,5402$	0,5962
Espessura do corpo caloso – RA (μm)	283,2 ± 28,56	320,1 ± 60,01	327,6 ± 82,46	$F_{2,16} = 1,054$	0,3717

Região anterior (RA) e posterior (RP)

Em concordância com tais resultados, Miyata *et al.* (2011) observaram que camundongos, ao serem imobilizados e imersos na água (21 dias/2h diárias), não

apresentaram alteração na espessura do corpo caloso, assim como na quantidade de OL. No entanto, os autores observaram alterações morfológicas caracterizadas pelo excesso de arborização dos processos dos oligodendrócitos, bem como o aumento do espaço interfibril, o qual é ocupado principalmente por essas células. Além disso, após três semanas do estresse tais parâmetros alterados estavam similares ao controle, indicando recuperação.

Ademais, Breton *et al.* (2021), relataram que ratos submetidos ao estresse de imobilização associado com a exposição ao odor de predador apresentaram redução de OL no hipocampo e no córtex pré-frontal somente em fêmeas a curto prazo (P40), mas a longo prazo (P95) foi observado redução apenas na sub-região CeA do corpo amigdalóide, tanto em fêmeas quanto machos. Assim, também demonstrando o período de recuperação, bem como apontando diferenças na resposta ao estresse de acordo com o sexo e a região cerebral.

Dessa forma, nota-se que existem vários fatores associados às respostas ao estresse como o período de recuperação e respostas diferentes de acordo com o sexo e a região cerebral. Portanto, os resultados de estudos de curto prazo se comparados com aqueles de longo prazo podem gerar erro de interpretação, assim como a comparação entre diferentes tipos de estresse, sexo e região do cérebro.

Conclusões

Nosso estudo aponta que o cérebro juvenil pode se adaptar ao estresse de curta frequência e curta intensidade, sem apresentar sequelas morfológicas duradouras na substância branca cerebral.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá pela concessão de bolsa de estudo.

Referências

BRADL, M.; LASSMANN, H. Oligodendrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 37-53, 2010.

BRETON, J. M. *et al.* Juvenile exposure to acute traumatic stress leads to long-lasting alterations in grey matter myelination in adult female but not male rats. **Neurobiology of Stress**, v. 14, 100319, 2021.

MIYATA, S. *et al.* Plasma corticosterone activates SGK1 and induces morphological changes in oligodendrocytes in corpus callosum. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

REYES-HARO, D. *et al.* Regional density of glial cells in the rat corpus callosum. **Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2013

SHONKOFF, J. P.; ANDREW, S.; GARNER, A. S. The Lifelong Effects of Early Childhood Adversity and Toxic Stress. **Pediatrics**, v. 129, n. 1, p. e232-e246, 2012.