

ESTRESSE JUVENIL FÍSICO E PSICOLÓGICO DE CURTA DURAÇÃO NÃO CAUSA ALTERAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DA MIELINA DO CORPO CALOSO DE RATOS MACHOS.

João Pablo Dias Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Silvana Regina De Melo (Orientadora), e-mail: ra112553@uem.br.

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

Ciências da Saúde / Psiquiatria

Palavras-chave: corpo caloso, estresse de imobilização, densidade óptica.

Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse físico e psicológico na fase juvenil de ratos sobre a integridade da substância branca do cérebro de ratos machos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Controle, Estresse Físico e Estresse Psicológico. Os procedimentos de estresse foram aplicados durante três dias consecutivos a partir dos 25 dias de vida pós-natal (P25). Na idade adulta, P90-P95, foi realizada coleta dos cérebros, que foram fixados e processados pela técnica de Kluver-Barrera. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os modelos de estresse não produziram alterações no peso corporal e cerebral, nem na integridade da substância branca das regiões do joelho, corpo e esplênio do corpo caloso. O estudo sugere que a longo prazo os efeitos de estresse juvenil de curta frequência não foram nem prejudiciais nem protetores, o que pode ser considerado adaptação positiva.

Introdução

O corpo caloso (CC) é composto principalmente por axônios, oligodendrócitos e astrócitos, sendo o principal transmissor de informações inter-hemisféricas. Com cerca de 200 milhões de fibras nervosas, constituem grande porção da substância branca do cérebro de roedores, e está dividido anatomicamente em joelho, corpo e esplênio. Em ratos, a mielinização das fibras do corpo caloso inicia-se por volta de P15 e o número de axônios mielinizados na região do esplênio de ratos aumenta de P25 a 60 (Reyes-Haro *et al.* 2013). Mesmo após completar seu desenvolvimento, o CC ainda é suscetível a mudanças morfológicas e funcionais, e tem-se demonstrado que a neuroplasticidade do CC depende do ambiente. Estudos clínicos relatam volumes menores do CC em crianças que foram expostas ao estresse no início da vida (De Bellis *et al.* 1999). Uma vez que o desenvolvimento do CC é um processo longo e sua estrutura pode ser

afetada por experiências, nossa pergunta é se o estresse na fase infantil provocaria alteração estrutural no CC. Assim, neste estudo nosso objetivo foi verificar se a longo prazo as respostas morfológicas a dois modelos de estresse (físico e psicológico) seriam diferentes, e analisar a integridade da substância branca do CC em diferentes regiões, joelho, corpo e esplênio.

Materiais e métodos

Foram utilizados ratos Wistar machos (n=15) adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, e aleatoriamente distribuídos nos grupos experimentais: Estresse de Imobilização (EF, n = 5), Estresse de Exposição ao predador (EP, n = 5) e Controle (n = 5) e mantidos em biotério setorial sob condições padrão com temperatura controlada sob um ciclo claro / escuro de 12h / 12h, alimento e água fornecidos ad libitum. 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. O estresse de Imobilização é considerado como estressor físico e foi aplicado entre os dias 25 e 27 pós-natal (P25-P27), nos quais os animais foram colocados em um tubo de contenção de por três períodos de 30 minutos, separados por intervalos de 15 minutos por 3 dias. Ao término da sessão de estresse, eram devolvidos às suas gaiolas de origem. Já o estresse do predador é considerado como estresse psicológico e foi realizado entre P25-P27, consistiu em duas caixas adjacentes separadas, a caixa do rato, quadrada e transparente com orifícios nas paredes. A câmara do gato, caixa quadrada com paredes em malha de arame quadrada. Os animais jovens foram colocados individualmente na câmara do rato por dois períodos de 10 minutos, separados por intervalos de 5 minutos durante 3 dias. Três gatas adultas foram utilizadas como estímulo predador, uma por dia, o qual foi mantido durante os dias do experimento dentro da câmara da gata. Ambos os procedimentos de estresse foram realizados sob luz branca, entre 7h00 e 17h00 e após cada sessão de estresse os aparelhos foram esterilizados com solução de etanol a 70%. O grupo de controle recebeu apenas intervenções humanas relacionadas à limpeza da gaiola. Após os procedimentos de estresse, os ratos foram deixados sem perturbação até a perfusão. Na idade adulta, P90 a P95, os animais foram anestesiados, após foram pesados e perfundidos intracardialmente com solução salina 0,9%, tamponada e solução de paraformaldeído 4% tamponado. O encéfalo foi removido, e seccionado as regiões do bulbo olfatório, nervos ópticos e medula espinal, e pós-fixados na mesma solução de paraformaldeído 4%, desidratados em etanol grau, clarificados em xileno e incluídos em parafina. As seções foram cortadas no plano coronal com espessura de 16 µm e coradas pela técnica de Klüver-Barrera contrastados com violeta cresil. As seguintes regiões do CC foram analisadas: anterior (Joelho = Bregma 2.28 a 1.56 mm), região central (Corpo= Bregma - 1,44 a - 4,96 mm) e parte posterior (Esplênio= Bregma - 5,04 a - 5,16 mm), de acordo com (Paxinos & Watson, 1998). Foram consideradas 9 campos por animal, obtidas a partir de 3 secções

semi-seriadas, com 3 campos aleatórios de cada secção. Para análise quantitativa, as imagens foram capturadas com objetiva 40X, usando câmera de alta resolução, anexada ao microscópio e transferida para computador usando ImagePro Plus software. Essas imagens foram então quantificadas por meio do programa ImageJ, onde analisou-se a densidade óptica. Experimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 499.305.061.7) da Universidade Estadual de Maringá.

Resultados e Discussão

A densidade óptica das regiões analisadas não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos Controle, Estresse Físico e Estresse Psicológico tanto para o Joelho quanto para o Corpo e Esplênio. Para região do Joelho verificamos $[F(2,11)= 0,79472, p=0,476]$, Corpo $[F(2,11)= 2,2337, p=0,153]$ e Esplênio $[F(2,11)= 1,5212, p=0,261]$ (Figura 1). Este resultado está coerente com análises anteriores realizadas por nosso grupo de estudo, onde verificamos que tanto a quantidade de núcleos gliais quanto a espessura da região central do CC não foram afetadas pelos mesmos modelos (de Melo *et al.* 2022). Os estudos clínicos que apontam redução de volume do CC foram em indivíduos que sofreram diversas formas de abuso (De Bellis *et al.* 1999), sugerindo que a fase infantil é sensível, e o corpo caloso pode ser moldado pelo estresse crônico. Em animais, estudo com ratos sob estresse de imobilização de longa frequência e intensidade (28 dias/4h diárias), houve alteração estrutural na mielina, incluindo distorção, desintegração, e redução no encéfalo anterior (telencéfalo + diencéfalo) e diminuição nos níveis de MBP (sigla em inglês para Proteína básica de mielina) Thamizhoviya & Vanisree (2019). Provavelmente o impacto da experiência de estresse na substância branca cerebral também depende da intensidade e duração do estresse. Juntos esses resultados sugerem que as respostas ao estresse estão relacionadas a diversas variáveis, como por exemplo a intensidade do estresse. Nosso estudo utilizou dois modelos de estresse cujo tempo e intensidade não foram prejudiciais para alterar em longo prazo o processo de mielinização nem o desenvolvimento do corpo caloso. Sob o aspecto morfológico, verificou-se que na vida adulta a estrutura morfológica do corpo caloso não foi prejudicada. Os resultados expostos aqui somados aos anteriores, tanto morfológicos no corpo caloso, quanto comportamentais (de Melo *et al.*, 2022) sugerem que: tanto o modelo de estresse físico da imobilização com período de (1:30 min) quanto estresse psicológico da exposição ao gato com período de (20 min) vivenciados por 3 dias durante a fase juvenil foram inócuos a longo prazo. Porém não podemos afirmar que houve alteração e recuperação durante o intervalo de 33 dias, ou se não houve alteração uma vez que não realizamos análise de curto prazo.

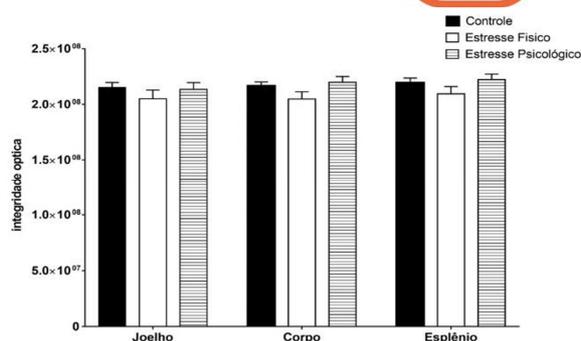


Figura 1 – Gráfico representando a densidade óptica das regiões do corpo caloso (J, GC e E) dos grupos C, EF e EP.

Conclusões

O estresse de curta frequência, físico da imobilização e psicológico da exposição do predador na fase juvenil não alterou o desenvolvimento da mielina do corpo caloso de ratos machos.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária e ao laboratório de Ciências Morfológicas da UEM. Agradeço também a minha orientadora por me auxiliar e me incentivar.

Referências

DE BELLIS, et al. Developmental Traumatology. Part II. BrainDevelopment. Biol Psychiatry, v.45, p. 1271-1284, 1999.

de MELO S.R, et al. Short juvenile stress has no long-lasting effects on anxiety-like behavior, object recognition memory, or gross brain morphology but affects dendritic spines in the hippocampus in male rats. Dev Neurosci. Mar 14. doi: 10.1159/000523955. 2022

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego. 1998

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

THAMIZHOVIYA, G.; VANISREE, A. J. Enriched environment modulates behavior, myelination and augments molecules governing the plasticity in the forebrain region of rats exposed to chronic immobilization stress. Metabolic Brain Disease, 2019. v. 34, n. 3, p. 875–887.