

NEUROPLASTICIDADE MORFOLÓGICA DE DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE JUVENIL (IMOBILIZAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO PREDADOR) NA DENSIDADE DE CÉLULAS GLIAIS E INTEGRIDADE DA MIELINA CEREBRAL DO FÓRNICE DE RATOS ADULTOS MACHOS.

Gustavo Henrique Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Leticia Alexandrino Barilli (Coautora) Silvana Regina de Melo (Orientador), e-mail: ra119929@uem.br.

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

Área e sub-área do conhecimento: Medicina - Psiquiatria

Palavras-chave: Desenvolvimento, densidade óptica, substância branca.

Resumo:

O fórnice é uma região do sistema límbico formada por feixes nervosos, constituído principalmente por axônios e células da glia com participação na cognição e transtornos mentais. O objetivo do estudo foi analisar os efeitos do estresse físico e psicológico na fase juvenil de ratos machos sobre o número de núcleos gliais e análise da densidade óptica no fórnice. Foram analisados três grupos: Controle, Estresse físico e Estresse Psicológico. Os modelos de estresse foram executados nos animais a partir dos 25 dias de vida pós-natal (P25), e na idade adulta, P90-P95, foi realizada coleta dos encéfalos, que foram fixados e processados pela técnica de Klüver-Barrera. A análise da integridade da substância branca por meio da análise da densidade óptica revelou que os modelos de estresse utilizados não induziram alterações na integridade da substância branca analisada em ambos os modelos de estresse.

Introdução

O fórnice é uma região de substância branca que promove conexão hipocampo-hipotálamo, e também hemisfério direito-esquerdo. Em função destas conexões, acredita-se que tenha papel importante na cognição, especialmente o aprendizado. A partir de suas conexões com estruturas importantes do sistema límbico, sugere-se então que a degeneração dos feixes do fórnice pode preceder anormalidades e ter conexões com alguns transtornos, como comprometimento cognitivo e a atrofia hipocampal (OISHI e LYKETSOS, 2016) e a anisotropia fracional da região relacionada a esquizofrenia em pessoas portadoras do transtorno (KLAUSER et al., 2018).

Estudos apontaram que indivíduos que sofreram estresse crônico e desenvolveram transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) tiveram menor índice de anisotropia (FA) em diferentes regiões cerebrais. E estudos em roedores transgênicos para a

proteína FKBP51 apresentaram maior anisotropia fracional em várias regiões cerebrais incluindo a região do fórnice (ENGEHLHARDT, et al., 2020).

Uma vez que o fórnice está relacionado à memória episódica, e no TEPT há dificuldade de reduzir memórias traumáticas, nossa hipótese é se o estresse infantil provocaria alterações anatômicas nesta região. E para analisar a integridade da substância branca no fórnice, realizamos preparados histológicos da região que foram corados com histotécnica de Klüver-Barrera e analisados por meio de densidade óptica.

Materiais e Métodos

Foram utilizados Ratos Wistar machos (n=15) adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, e distribuídos nos grupos: Estresse de imobilização denominado Físico (EF, n = 5), Estresse de Exposição ao predador denominado Psicológico (EP, n = 5) e Controle (n = 5). Os experimentos foram realizados de acordo com os procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local (autorização CEUA nº 499.305.061.7) da Universidade Estadual de Maringá.

O EF foi aplicado entre os dias 25 e 27 pós-natal (P25-P27), onde os animais foram colocados em um tubo de contenção de plástico (10 cm x 4 cm) por três períodos de 30 minutos, separados por intervalos de 15 minutos por 3 dias. O EP foi realizado entre P25-P27, e consistiu em duas caixas adjacentes separadas, uma caixa (15cm x 27cm x 21cm) para o rato e uma gaiola (80cm x 80cm x 60cm) para o gato. O estresse ocorreu de forma individual entre os animais e teve duração de 10 minutos por dois períodos, separados por intervalos de 5 minutos durante 3 dias. O grupo controle recebeu apenas intervenções humanas relacionadas à limpeza da gaiola. Após os procedimentos de estresse, os ratos foram deixados sem perturbação até a perfusão.

Para a quantificação dos núcleos da glia, foram consideradas secções entre os bregmas -0,12mm ao -4,68mm (PAXINOS e WATSON,1998), abrangendo 5 secções semi-seriadas e 2 campos de cada secção, sendo estes representativos do lado direito e esquerdo, totalizando 10 campos para cada animal. Então foi realizada quantificação dos núcleos de células gliais, considerando a calibração do do campo teste utilizado, cada unidade ocular equivale a 12,5 µm, assim, a área total analisada por campo foi de 15.625 µm². Para quantificação da densidade óptica foram considerados secções entre os bregmas -0.36 e -0.60 (Paxinos e Watson, 1998), onde para cada animal, foi capturado microfotografia das regiões direita e esquerda do fórnice. As imagens foram processadas por meio do programa de análise de imagem "imageJ", onde foram obtidos dados da integridade da região analisada.

Assim os dados foram expressos como média ± desvio padrão (n/10.000 µm² e foi feita a análise de variância One-Way (ANOVA One-way) seguido do pós-teste Tukey para comparação entre os grupos (GraphPad Prism 9.0), considerando um nível de significância de 5% (p<0,05).

Resultados e Discussão

Estudo anterior, com os mesmos animais apontou que a glândula supra-renal também não sofreu alteração no peso ou morfológica (KATO et al., 2020). Esse dado sugere que os modelos empregados não foram tóxicos a ponto de alterar medidas como peso. Além disso, há tendência de se recuperar o peso, e em nosso estudo o período de recuperação pode ter sido um dos mecanismos. Infelizmente neste estudo não verificamos os efeitos com pouco tempo de recuperação.

Nossos resultados apontaram que houve redução no número de núcleos gliais no grupo estresse psicológico comparado do grupo controle, no entanto não foi observado padrão reutivo com relação à densidade óptica no mesmo grupo, mas as interpretações ainda são vagas, e nosso estudo parece ser o primeiro na literatura a estudar a relação entre fórnice e os modelos de estresse de imobilização e exposição ao predador. Sendo assim, há necessidade de outros estudos sobre os efeitos do tipo do estresse nesta área e, assim como os efeitos após determinados tempos de recuperação para complementar os resultados.

Na fase juvenil de ratos de laboratório entre P22 E P34 a mielinização do cérebro ainda é incompleta, e para investigar a integridade do fórnice, ao efeito do estresse na fase juvenil, foi analisada a densidade óptica da região, o que se refere ao grau de enegrecimento das imagens processadas, onde quanto mais claro mais luz passa pelo tecido, ou seja, há um grau de mielinização maior. Avaliamos o efeito de dois modelos de estresse na fase juvenil, e verificamos que ambos os modelos, físico e psicológico não provocaram quaisquer alterações no parâmetro analisado.

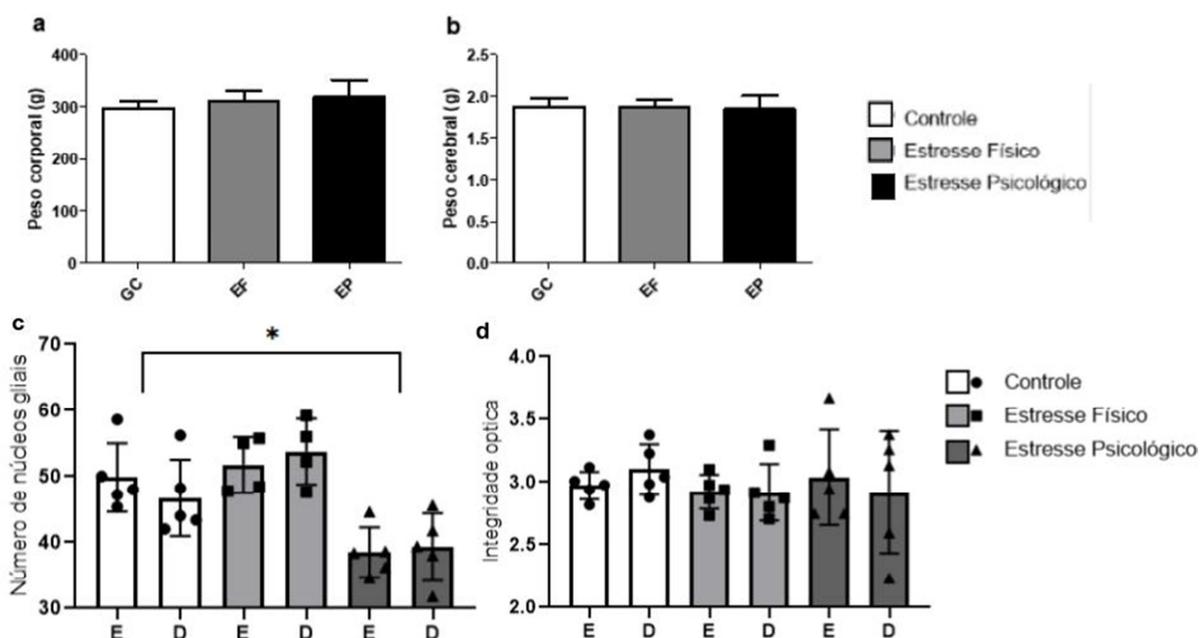


Figura 1 - Gráficos representando os dados expressos como média \pm desvio padrão do peso corporal (a) e cerebral (b) dos animais (cada grupo, n = 14). Grupo Controle (GC); Estresse Físico (EF) e Estresse Psicológico (EP). Gráfico representando os dados expressos como média \pm desvio padrão do número de núcleos gliais por hemisfério de cada grupo (c). Gráfico representando os dados

expressos como média \pm desvio padrão da densidade óptica do fórnice por animal. Hemisfério Esquerdo (E); Hemisfério Direito (D).

Conclusões

Nosso estudo nos permite concluir que os modelos de estresse em curta frequência não provocaram alterações anatômicas a longo prazo no fórnice em relação a integridade da substância branca. Mas é preciso investigar se houve dano após o evento estressante e se houve a recuperação, ou se o modelo não foi capaz de provocar prejuízos morfológicos.

Agradecimentos

Ao PIBIC-CNPq-FA-UEM pela oportunidade e pelo apoio financeiro. Aos pesquisadores, de maneira geral, aos autores que realizaram tais estudos publicados no mundo inteiro, tão importantes para a geração de informações sobre os impactos do estresse no cérebro e responsáveis pela contribuição nas tecnologias que prezam a saúde mental dos seres humanos.

Referências

ENGELHARDT, C. et al. Lack of FKBP51 shapes brain structure and connectivity in male mice. **J. Magn Reson Imaging**, v. 53, p. 1358-1365. 2021.

KATO, K. T. et al. Efeitos do estresse físico e psicológico juvenil sobre a glândula suprarrenal em ratos adultos. **Saúde e Pesquisa**, v. 13, n. 1, p. 53-61. 2020.

KLAUSER, P. et al. N-acetylcysteine add-on treatment leads to an improvement of fornix white matter integrity in early psychosis: a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Transl Psychiatry**, v. 8, p. 220. 2018.

OISHI, K.; LYKETSOS, C. G. Editorial: Alzheimer's Disease and the Fornix. **Front. Aging Neurosci**, v. 8, p. 149, 2016.

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