

## EFEITOS DO ESTRESSE JUVENIL DE ISOLAMENTO SOCIAL NO VOLUME E DENSIDADE NEURONAL DO HIPOCAMPO E ESPESSURA E DENSIDADE GLIAL DO CORPO CALOSO EM RATOS MACHOS ADULTOS

Milena Babugia Pinto (PIBIC/FA/UEM), Gustavo Henrique Pereira (coautor), Mariane Ferreira Vieira (coautor), Humberto Milani (Orientador). Email: hmilani@uem.br, Silvana Regina de Melo (Coorientadora). Email: srmelo@uem.br  
Universidade estadual de Maringá, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Maringá, PR.

### Farmacologia/Neuropsicofarmacologia

**Palavras-chaves:** Isolamento social; corpo caloso; substância branca.

### RESUMO

A exposição ao estresse crônico na fase juvenil pode afetar o desenvolvimento normal de áreas cerebrais. Nesse estudo investigamos se o isolamento social na fase juvenil impacta a morfologia do hipocampo e corpo caloso na fase adulta. Ratos Wistar machos foram distribuídos em dois grupos (n=5 cada) denominados como Controle (C), e Estresse de Isolamento Social (EIS). Nas idades entre 21 a 35 dias pós-natal (P21-P35), os animais do grupo EIS foram isolados, e ressocializados em P36, e entre P61 e P67 foram submetidos a testes comportamentais e eutanasiados em P68. Os pesos dos animais e de seus encéfalos foram verificados em P21, P36, P61, P68, e não houve alterações entre os grupos. Também não houve diferença na espessura e densidade glial no corpo caloso, e volume do hipocampo.

### INTRODUÇÃO

Estima-se que, após a pandemia, mais de 200 milhões de pessoas sofram com depressão e cerca de 300 milhões tenham ansiedade no mundo. Diante disso, é essencial a compreensão do modo que o estresse pode impactar determinadas regiões cerebrais e predispor a esses transtornos.

Um estudo com camundongos evidenciou que o estresse de isolamento social aplicado antes do dia do desmame (P21) provoca redução no volume de células piramidais da região CA1 do hipocampo (HENG, et al. 2023) ou no hipocampo total (SCHOENFELD, et al. 2017). Isso sugere que o estresse de início de vida impacta no desenvolvimento de regiões subcorticais como no hipocampo. Diante disso,

nesse estudo investigamos se o estresse de isolamento social na fase juvenil impacta na morfologia hipocampal, e no corpo caloso examinados na fase adulta.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Dez filhotes de ratos Wistar machos foram separados nas idades P21-P35 em dois grupos: 1) grupo estresse de isolamento social (EIS), no qual apenas um animal foi mantido por gaiola, e 2) grupo controle (C), sendo mantidos 3 animais por gaiola. Em P36, o grupo EIS foi ressocializado, e em P61 foram submetidos a testes comportamentais em P68 foram pesados e em seguida seus cérebros foram perfundidos com solução salina e fixador Bouin. Após esses procedimentos os encéfalos dos animais foram removidos e pós-fixados. O material foi congelado com nitrogênio líquido (-55°C) e seccionados (40 µm) com o uso de criostato e corados pela técnica de Nissl. A espessura do corpo caloso foi medida com uma régua milimetrada inserida na ocular do microscópio óptico (objetiva X10). A densidade dos núcleos de células gliais do corpo caloso foi mensurada por um sistema teste de grades inserido na ocular do microscópio óptico (objetiva 40X), e analisou-se 3 secções distintas em dois campos aleatórios. O volume total do hipocampo foi estimado utilizando princípio de Cavalieri, a partir de 8 sessões por animal. As imagens foram capturadas num microscópio Leica (objetiva 1X), e foram submetidas a um sistema teste de pontos. Os dados foram analisados utilizando o programa *Graph Prism 8* e submetidos à análise da distribuição normal e homoscedasticidade. Cumprindo os requisitos, foram realizadas análises paramétricas (*one-way anova* e *post-hoc* de *Tukey*), caso não, foram realizadas análises não paramétricas (teste de *Kruskal Wallis* com *post-hoc* de *Dunn*), considerando significativo  $p < 0,05$ . Esse estudo foi aprovado pelo CEUA/UEM (nº9639231121).

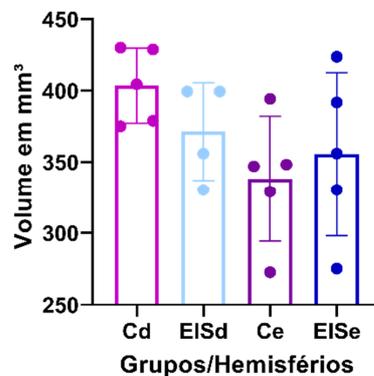
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística significativa no peso dos animais em P21, P36, P61 e P68), bem como dos seus cérebros (P68), sugerindo que o impacto do estresse se negativo, foi restaurado pelo tempo de ressocialização.

A espessura do corpo caloso no grupo submetidos ao estresse de isolamento social (EIS) foi ligeiramente aumentado, porém sem significância estatística [ $F(1,8)=0.59$ ,  $p=0.46$ ]. Do mesmo modo, a densidade das células gliais não foi diferente entre os grupos. Porém, um estudo com camundongos que apresentou o mesmo modelo de estresse do presente estudo, ou seja, os animais passaram pelo isolamento social a partir de P21, onde permaneceram por 2 semanas, evidenciou que no 65 dia não houve alteração da densidade dos oligodendrócitos em região do

córtex pré-frontal (MAKINODAN, et al. 2012), tal fato é similar aos nossos achados para a região do corpo caloso. Entretanto, em uma análise por meio de microscópio eletrônico, o estudo revelou redução na mielinização do grupo isolado em P65. Isso sugere que o isolamento social pode ser tóxico para a mielinização, mas que não é evidenciada em análises estruturais como realizadas em nosso estudo.

No volume do hipocampo também não se verificou diferença estatística entre os grupos investigados, e em face à tendência de diminuição de volume, este resultado precisa ser melhor investigado (figura 1).



**Figura 1-** Volume (mm<sup>3</sup>) do hipocampo dos hemisférios esquerdo e direito dos animais submetidos ao estresse de isolamento social em comparação ao grupo controle. Cd, grupo controle, hemisfério direito; Ce, grupo controle hemisfério esquerdo; EISe, grupo estresse de isolamento social, hemisfério esquerdo; EISd, grupo estresse de isolamento social, hemisfério direito. Os valores são a média ± desvio padrão. Nível de significância  $p < 0,05$

Essa análise discerniu da nossa hipótese prévia pautada em uma possível redução de volume, uma vez que há evidências de atrofia hipocampal no transtorno do estresse pós-traumático, e Alzheimer. A literatura já evidenciou que na infância determinados tipos de estresse crônicos são capazes de afetar o volume do hipocampo, um exemplo disso foi o estudo de Fabricius *et al.* (2010) em que ratos após 15 semanas de isolamento apresentaram redução total do volume hipocampal, bem como de subáreas (CA2, CA3, GD). Outro estudo utilizando a metodologia do estresse crônico imprevisível em ratos, durante quatro semanas, demonstrou redução no volume hipocampal a longo prazo, o mesmo padrão foi verificado nas suas subáreas (SHOENFELD, et al. 2017). Esses dados sugerem que os efeitos tardios do estresse estão intrinsecamente vinculados ao tipo, modelo animal, e intensidade do agente estressor.

## CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que o estresse de isolamento social por 15 dias consecutivos na fase juvenil não foi tóxico a fim de provocar alterações estruturais gerais como no volume total do hipocampo e na espessura e densidade de núcleos das células gliais do corpo caloso. Mas, em função de dados sugerindo tendência de alteração de volume do hipocampo, novas análises estatísticas permitirão melhor acurácia do resultado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo incentivo a essa produção científica, e aos meus orientadores e colegas de laboratório.

## REFERÊNCIAS

FABRICIUS, K.; HELBOE, L.; STEINIGER-BRACH, B.; FINK-JENSEN, A.; PAKKENBERG, B. Stereological brain volume changes in post-weaned socially isolated rats. **Brain Research**, v. 1345, p. 233-239, 23 jul. 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.05.040. [PMID: 20546705]. Acesso em: 21 de jul. 2024.

HENG, V.; ZIGMOND, M.; SMEYNE, R. J. Neuroanatomical and neurochemical effects of prolonged social isolation in adult mice. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 17, p. 1190291, 2023. DOI: 10.3389/fnana.2023.1190291. Acesso em 17 ago 2024.

MAKINODAN, M.; ROSEN, K. M.; ITO, S.; CORFAS, G. A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. **Science**, v. 337, n. 6100, p. 1357-1360, 14 set. 2012. DOI: 10.1126/science.1220845. [PMID: 22984073; PMCID: PMC4165613]. Acesso em: 10 de ago. de 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório de saúde mental**. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/356119/9789240049338-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 24 ago. 2024.

SCHOENFELD, T. J.; McCAUSLAND, H. C.; MORRIS, H. D.; PADMANABAN, V.; CAMERON, H. A. Stress and loss of adult neurogenesis differentially reduce hippocampal volume. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 12, p. 914-923, 2017. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.05.013. Acesso em: 20 de jul. 2024