

ESTRESSE JUVENIL TEM EFEITO TIPO E SEXO-DEPENDENTE NA MORFOLOGIA DO HIPOCAMPO DE RATOS

Larissa Celine Violin (PIBIC/CNPq), Gustavo Henrique Pereira (coautor), Leticia Alexandrino Barilli (coautora), Humberto Milani (coautor), Silvana Regina de Melo (Orientadora). E-mail: smelo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Morfológicas,
Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Histologia.

Palavras-chave: isolamento social; hipocampo; corpo caloso.

RESUMO

Diferentes estressores, especialmente na infância, podem predispor a transtornos mentais, e, sugere-se que estão associados a alterações estruturais em determinadas áreas do encéfalo. Neste estudo, analisaram-se os efeitos do estresse por isolamento social e imobilização em ratos machos e fêmeas na fase juvenil, e suas consequências na espessura da camada piramidal do hipocampo e no volume do corpo caloso. Três grupos foram avaliados: Controle (C), Estresse por Isolamento Social (EIS) e Estresse por Imobilização (EI). Os estressores foram aplicados entre os dias 21 e 35 pós-natal (P21-P35), e na idade P43, os encéfalos foram coletados e processados com a técnica de Kluver-Barrera para análise morfométrica. Na análise do volume do corpo caloso não foram observadas alterações significativas em nenhum grupo ou sexo. No entanto, o estresse de imobilização provocou efeito trófico e sexo-dependente. Verificou-se apenas nos machos do grupo EI houve aumento significativo na espessura da camada piramidal do hipocampo em comparação aos grupos C e EIS.

INTRODUÇÃO

Com o advento da pandemia do COVID-19 e as medidas de distanciamento social impostas nesse período, demandou-se maior atenção para os efeitos patológicos gerados pelo isolamento social com relação à saúde mental, entre eles a ansiedade e depressão. Principalmente na primeira infância, diferentes estressores, como o isolamento social e a imobilização, tem capacidade neurodegenerativa, afetando a plasticidade cerebral inerente dessa fase. De forma análoga, a exposição a estressores em roedores, principalmente de forma crônica, é capaz de induzir diversas alterações, entre elas supressão do sistema imunológico, alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e, também, comportamentos semelhantes à ansiedade e à depressão (Du Preez *et al.*, 2020). A problemática levantada é se o isolamento social e imobilização na infância poderia impactar na estrutura de áreas cerebrais, como o hipocampo (HPC) e o corpo caloso (CC), que além de estarem em

desenvolvimento, são também sensíveis ao estresse, pois apresentam receptores para o cortisol.

O HPC é formado majoritariamente por substância cinzenta, sendo fundamental no processamento de memórias e emoções. É uma área de intensa neurogênese e poda neuronal, especialmente no início da vida. Evidencia-se que o volume hipocampal aumenta até a adolescência, momento em que tem pequena redução (Buthmann *et al.*, 2024). Por outro lado, o CC também se configura como região importante no estudo do estresse. É composto inteiramente por substância branca, contendo os axônios mielinizados, que permitem a rápida transmissão de informações interneuronais. Em humanos, a mielinização tem seu pico na infância, e algumas áreas é ainda intenso na adolescência, enquanto em ratos tem seu pico máximo entre 10 e 20 dias pós-natais, com lenta progressão na idade adulta (Cho, H.; Han, S.; Cho, H. J., 2023).

Portanto, a utilização dos modelos animais de estresse pós desmame por imobilização e isolamento social faz-se necessária a fim de compreender a neurobiologia do estresse crônico, possibilitando o estudo de possíveis alterações morfo-anatômicas cerebrais em indivíduos jovens. Neste estudo, o objetivo foi verificar se os modelos de estresse juvenil estão associados a alterações no volume do CC e na espessura de camada piramidal das sub-regiões CA1, CA2 e GD do HPC, de ratos machos e fêmeas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) de ambos os sexos, provenientes de fêmeas prenhas do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais, de diferentes ninhadas para garantir variabilidade genética, foram distribuídos em três grupos: Controle (C), Estresse de Imobilização (EI) e Estresse de Isolamento Social (EIS).

No grupo EIS, os animais foram isolados em caixas de propileno entre P21 e P35, com acesso apenas a estímulos olfativos, visuais e auditivos. No grupo EI, após o desmame, foram colocados em caixas cilíndricas de propileno (4 cm de diâmetro x 12 cm de comprimento) e imobilizados diariamente por 2 horas durante 15 dias, entre P21-P35. Em P43, os animais foram anestesiados e pesados. A perfusão foi realizada com solução salina tamponada, seguida de paraformaldeído 4% tamponado, em que, cada solução perfundiu o animal por cinco minutos, a um fluxo de 2ml/min. Os encéfalos foram removidos, e após pós-fixação em PFA, crioprotetidos em sacarose 30%, congelados em isopentano a -55 °C e seccionados em criostato (50 µm).

Os encéfalos foram processados utilizando a técnica de Kluver-Barrera e as secções foram utilizadas para análise morfométrica. O volume do CC foi estimado por estereologia (Princípio de Cavalieri), usando 8 secções de cada animal, entre os bregmas 1,60mm e -3,60mm. Para análise do HPC, verificamos a espessura da camada piramidal nas sub-regiões CA1, CA2 e a camada granular do GD. Utilizou-se régua milimetrada em uma secção por animal, entre os bregmas -3,00 mm e -3,60 mm. As imagens foram capturadas e os dados foram analisados utilizando o programa *Graph Prism 8*. O efeito do estresse foi analisado separadamente entre

machos e fêmeas (Machos: C x EIS x I; Fêmeas: C x EIS x I), considerando significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No HPC, verificou-se que, quanto à espessura da camada piramidal, nas regiões CA1 e CA2, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos estressados com controle. No entanto, na região do GD observou-se aumento significativo na espessura da camada celular granulosa, mas que foi específica para os animais machos do grupo EI ($p = 0,0047$) (Figura 1). Sugere-se na literatura, que o estresse, quando tóxico, exerça efeito redutivo nessa estrutura, sendo descrito a supressão da proliferação celular, atrofia da região, redução no comprimento e número de neurônios (Schoenfeld; Gould, 2012). Portanto, o resultado encontrado sugere que a resposta no hipocampo não foi tóxica, e refletiu maior atividade nesta região. Atribui-se esse resultado à manipulação diária dos animais, à transferência para um ambiente diferente e à subsequente adaptação, indicando a possibilidade de recuperação durante o intervalo entre os testes comportamentais.

Com relação ao volume do CC (Tabela 1), em fêmeas e machos houve tendência de diminuição volumétrica nos indivíduos dos grupos EIS e EI quando comparados a C, porém estas alterações não foram significativas. Na literatura, há evidências que o estresse no início da vida está relacionado a alterações microestruturais na substância branca do CC, embora não resulte em mudanças volumétricas (Paul *et al.*, 2008).

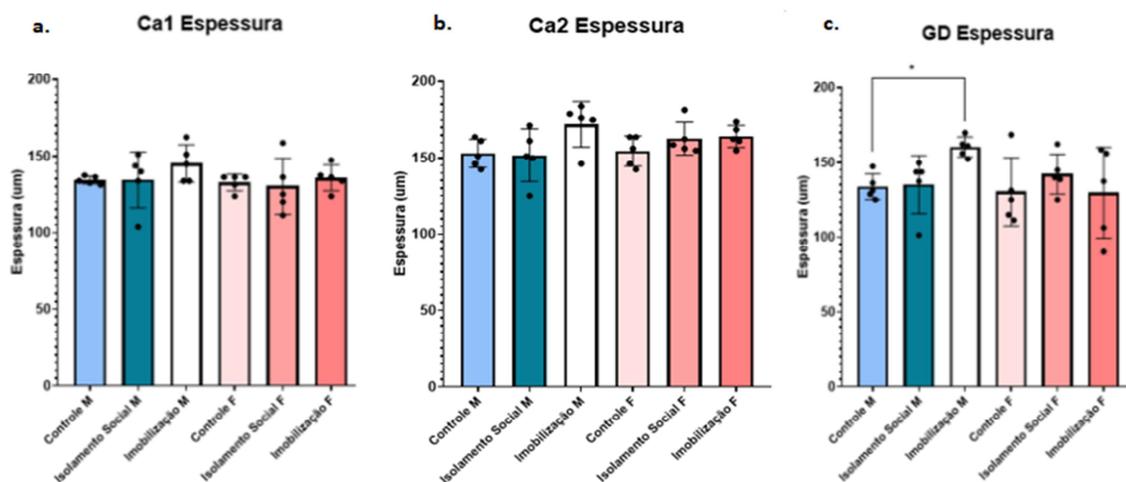


Figura 1 - Gráficos representando os dados expressos como média \pm desvio padrão da espessura da camada piramidal do hipocampo nas regiões CA1 (a), CA2 (b) e GD (c). Nível de significância $p < 0,05$. Controle (C; $n = 4$ machos (M) e $n = 4$ fêmeas (F)), Estresse de Isolamento Social (EIS; $n = 5$ M e $n = 4$ F) e Estresse de Imobilização (EI; $n = 4$ M e $n = 5$ F).

Tabela 1 - Relação de volume do corpo caloso em machos e fêmeas, expresso em média \pm desvio padrão. Controle (C; n= 5M e n = 5F), Estresse de Isolamento Social

	C	EIS	EI
Machos	1,18 \pm 0,07	1,17 \pm 0,03	1,11 \pm 0,06
Fêmeas	1,21 \pm 0,03	1,16 \pm 0,05	1,03 \pm 0,06

(EIS; n= 5M e n= 5F) e Estresse de Imobilização (EI; n= 5M e n= 5F).

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados confirmam que a resposta cerebral depende do tipo de estresse. Enquanto o isolamento social crônico por 15 dias durante a infância não provocou quaisquer alterações na estrutura geral do HPC e CC, o estresse de imobilização provocou efeito trófico e sexo-dependente. Os modelos não provocaram prejuízos estruturais nas regiões analisadas, porém, foi capaz de aumentar a espessura da camada celular granulosa do GD.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela oportunidade de adentrar no mundo científico, à UEM pelo ensino de qualidade e à minha orientadora, pela dedicação e paciência.

REFERÊNCIAS

BUTHMANN, J.L. *et al.* Early life stress predicts trajectories of emotional problems and hippocampal volume in adolescence. **Eur Child Adolesc Psychiatry**. v. 33, n. 7, p.2331-2342. 2024.

CHO, H.; HAN, S.; CHO, H.J. Empirical relationship between TEM-derived myelin volume fraction and MRI-R₂ values in aging ex vivo rat corpus callosum. **Magn Reson Imaging**. v.103, p. 75-83, nov. 2023.

DU PREEZ, A. *et al.* The type of stress matters: repeated injection and permanent social isolation stress in male mice have a differential effect on anxiety- and depressive-like behaviors, and associated biological alterations. **Transl Psychiatry**. v. 10, n. 1, p. 325, set. 2020.

SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Exp Neurol**. v. 233, n. 1, p. 12-21, jan. 2012.

33º Encontro Anual de Iniciação Científica
13º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de Outubro de 2024

PAUL, R. et al. The relationship between early life stress and microstructural integrity of the corpus callosum in a non-clinical population. **Neuropsychiatr Dis Treat.** v. 4, n. 1, p. 193-201, fev. 2008.

