

ANÁLISE MORFOMÉTRICA NO HIPOCAMPO DOS EFEITOS DE DIFERENTES ESTRESSORES JUVENIS EM RATOS MACHOS E FÊMEAS NAS FASES DA ADOLESCÊNCIA E ADULTA.

Milena Babugia Pinto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Larissa Celine Violin (Colaboradora), Humberto Milani (Colaborador); Silvana Regina de Melo (Orientadora). E-mail: srmelo@uem.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Farmacologia/Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: Imobilização; Isolamento Social; Infância; Hipocampo.

RESUMO

Estressores na infância podem predispor a transtornos mentais, alterar o desenvolvimento de estruturas cerebrais e influenciar o comportamento. Este estudo analisou os efeitos do estresse por imobilização e isolamento social em ratos de ambos sexos na fase juvenil e adulta respectivamente. Analisou-se o córtex hipocampal, onde foi mensurado a espessura nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e no giro denteado (GD). Foram avaliados os grupo Controle (C) x Estresse por Imobilização (EI) e C x Estresse de Isolamento Social (EIS). O EI e EIS foram aplicados entre o dia pós-natal 21 a 35 (P21–P35) e eutanasiados em P43. Os animais do grupo EIS foram isolados em P21 a P35, e ressocializados em P36, e eutanasiados em P68. Após os experimentos, os encéfalos foram coletados, processados para coloração de Nissl e analisados por morfometria em microscopia óptica. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 8 (EI) e Statistica (EIS), utilizando Two-way ANOVA, com significância de $p < 0,05$. O estresse por imobilização provocou efeitos redutivos na espessura das camadas piramidais em CA1, CA2 e CA3, mas, aumento na camada granular do GD em ambos os sexos. Por sua vez, o estresse do isolamento social teve impacto duradouro na estrutura do GD em machos, demonstrado pela redução da espessura na camada granular.

INTRODUÇÃO

O cérebro juvenil é altamente dinâmico sendo alvo de processos como neurogênese e podas sinápticas, em função disso é vulnerável a situações adversas (HANSON et al., 2015). Desse modo, a infância e adolescência constituem períodos de máxima plasticidade cerebral e são críticas para o desenvolvimento dos circuitos neuronais (MORISHITA et al., 2021).

O modelo de estresse por imobilização, é impactante ao animal, em especial, por restringir seus movimentos naturais, além disso, provoca alterações

comportamentais, fisiológicas e morfológicas significativas (ARAKAWA, 2020). Já o isolamento social é um tipo de estresse prolongado que vem sendo associado a mudanças comportamentais em roedores como aumento da atividade locomotora, ansiedade, e agressão (FONE et al., 2008). Em função de o hipocampo ser extremamente vulnerável ao estresse, principalmente, por possuir receptores para glicocorticóides, sabe-se que os neurônios do giro denteado (GD) sofrem intensa poda neuronal no início da vida (BUTHMANN et al., 2024). Dessa forma, é imperativo verificar se o modelo de estresse juvenil e de isolamento social seguido por um período de ressocialização, são capazes de provocar alterações nas camadas do córtex do hipocampo a saber: CA1, CA2, CA3 e granular do GD de ratos adolescentes e adultos machos e fêmeas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) de ambos os sexos provenientes de fêmeas prenhas obtidas do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos em condições padrão de alojamento e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, dois como Controle (C) e o de Estresse de Imobilização (EI) e Estresse de Isolamento Social (EIS). O projeto foi aprovado pelo CEUA/UEM, número 963.923.112-1.

Imobilização

Após P21 os animais foram dispostos em caixas cilíndricas de propileno transparente com 4 cm x 12cm. Cada caixa continha apenas um animal e em região frontal havia perfurações na parede para respiração. Os animais permaneceram imobilizados diariamente por 2h durante 15 dias, entre P21-P35, e em P43 foram eutanasiados.

Isolamento Social

Nas idades P21-P35 os animais foram separados, os EIS permaneceram sozinhos em caixas de propileno (18X34X41cm), enquanto no grupo controle foram mantidos 3 por caixa, com liberdade de interação. Na idade P36 os animais do grupo EIS foram ressocializados por sexo e mantidos em grupo até P68, idade em que foram eutanasiados.

Análise morfológica cerebral

A espessura das camadas piramidais e granular nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e GD, para o experimento de imobilização, foram aferidas em duas secções cerebrais (bregmas: -2.30 e -4.16) em ambos hemisférios. Cada secção foi medida duas vezes (no GD realizou-se quatro medidas), utilizando uma régua acoplada ao microscópio óptico, e a média dessas medidas foi calculada para garantir maior precisão. No experimento de isolamento social foram analisadas 3 secções (bregmas: -3.60, -3.80 e -4.16) em ambos hemisférios. E além da espessura da camada piramidal e granular, foi estimado a espessura total da sub-região CA3 e GD. As imagens foram capturadas, por meio do vídeo microscópio Leica (objetiva 1X), analisadas via software ImageJ. Todos os bregmas foram escolhidos conforme a referência de Paxinos e Watson (1998).

Análise estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism 8 (modelo de imobilização), e Statistica (modelo de isolamento social). Realizou-se uma análise paramétrica Two-way ANOVA, seguida do teste post-hoc de Sidak/Tukey para comparações múltiplas. Considerou-se o grupo experimental (Controle x Imobilização, ou Controle x Isolamento Social) e o sexo (macho x fêmea) como fatores independentes considerando $p < 0,05$ significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo de estresse por imobilização alterou a espessura das camadas piramidais. Em CA1, no bregma 1 e na média a redução foi significativa em relação ao controle ($p=0,0125$ e $p=0,0150$ respectivamente) para ambos os sexos. Na sub-região CA2 houve redução apenas na região do bregma 2 em ambos os sexos ($p=0,0344$). Em CA3 não houve diferenças significativas entre os grupos de ambos os sexos, e no GD a camada granular foi sensível ao estresse, e observou-se aumento da espessura em no bregma 1 ($p=0,0447$) em ambos os sexos. Os resultados encontrados nas sub-regiões CA1 e CA2 estão em conformidade com a literatura que evidencia a toxicidade do estresse em função do efeito redutivo da camada piramidal, uma vez que há supressão da proliferação celular, redução no comprimento e número de neurônios (MYCHASIUK et al., 2011). Para o GD é sabido que o aumento da camada granular após o estresse pode refletir um momento transitório de proliferação celular como forma de compensar o dano sofrido por meio do estresse em outras regiões hipocampais (XIA et al., 2014), essas informações estão de acordo com os nossos resultados provando que o estresse de imobilização foi tóxico o suficiente para impactar as sub-regiões do hipocampo.

Para o estresse de isolamento social observou-se efeito redutor na espessura da camada granular do GD no grupo IS ($F_{1,36}=10.09$, $p=0.003$), mas apenas nos machos. Na camada piramidal das regiões CA1, CA2, e CA3 não houve significância em ambos os sexos, e esse mesmo efeito foi averiguado na análise da espessura total da região CA2 e GD. Tais achados estão em conformidade com a literatura que evidência em humanos com transtorno do estresse pós-traumático adquirido na infância o hipocampo, apesar do não comprometimento estrutural, quando analisado em crianças, apresenta-se morfológicamente alterado em idade adulta, incluindo o giro denteado (BREMNER et al.; 1997; DE BELLIS et al.; 1999). Acredita-se que isso ocorra em detrimento da neurotoxicidade gradual do estresse sobre o hipocampo (SAPOLSKY et al., 1985). É escasso na literatura estudos sobre os efeitos da ressocialização após o isolamento social juvenil, e nossos resultados são pioneiros.

CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados vão de encontro ao escopo da literatura onde se constata que os efeitos são dependentes do estresse e do sexo, e os efeitos estruturais na região do hipocampo não seguem um simples padrão. Em resposta ao estresse crônico de imobilização os efeitos foram especialmente redutivos nas sub-regiões CA1, CA2, e curiosamente tróficos na região do GD. No

entanto, as respostas ao estresse de isolamento social após período de ressocialização afetou redutivamente apenas a região do GD.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo incentivo a essa produção científica, à minha orientadora, aos profs. Drs. Humberto Milani e Rubia M.M.Weffort de Oliveira e colegas do grupo de pesquisa Estresse e Resiliência.

REFERÊNCIAS

ARAKAWA, H. Restraint stress activates defensive behaviors in male rats depending on age and housing condition. **Physiology & Behavior**, v. 1, n. 224, out. 2020.

BREMNER, J. D. et al. Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse—a preliminary report. **Biological Psychiatry**, New York, v. 41, n. 1, p. 23-32, 1997.

DE BELLIS, M. D. et al. A E. Bennett research award. Developmental traumatology. Part II: brain development. **Biological Psychiatry**, New York, v. 45, n. 10, p. 1271-1284, 1999.

FONE, K. C.; PORKESS, M. V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1087-1102, 2008. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.03.003.

HANSON, J. L. *et al.* Behavioral problems after early life stress: contributions of the hippocampus and amygdala. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 314-323, 2015.

MORISHITA, H. A prefrontal social circuit vulnerable to juvenile social isolation. **Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 229-230, jan. 2021.

MYCHASIUK, R. *et al.* Prenatal bystander stress alters brain, behavior, and the epigenome of developing rat offspring. **Developmental Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 159-169, 2011.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 5, n. 5, p. 1222-1227, 1985.