

ESTRESSE ALIMENTAR CRÔNICO: EFEITOS PROLONGADOS SOBRE A MORFOLOGIA DO HIPOCAMPO E SOBRE AS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS.

Fernanda Daryella da Silva Borges¹; Lisiane Oliveira dos Santos²

¹Estudante do Curso de Nutrição- CAV – UFPE; E-mail: nanda_-_borges@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Enfermagem – CAV – UFPE. E-mail: lisianenutricao@yahoo.com.br.

Sumário: O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos tardios do estresse alimentar crônico sobre a morfologia do hipocampo em ratos. Foram utilizados 20 ratos wistar separados em dois grupos: teste (n=10) e controle (n=10). O Estresse Alimentar teve início a partir do 60º dia de vida e perdurou por um mês, após este tempo eles tiveram um mês descanso onde nenhum tipo estresse foi aplicado, e só assim os animais foram anestesiados e sacrificados. Foram realizados todos os procedimentos histológicos para obter as lâminas histológicas e foi utilizado a técnica de AgNOR para coloração. As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por uma câmera e analisadas por um software para contagem celular e os resultados foram submetidos ao teste T de student. Foi observado que quanto ao número de neurônios por campo na camada granular do hipocampo, não foi observada diferença entre os dois grupos, entretanto o grupo estresse apresentou maior número por campo de células da glia que o grupo controle.

Palavras-chave: Estresse Crônico; Glia; Hipocampo; Neurônio.

INTRODUÇÃO

O hipocampo, área telencefálica pertencente ao lobo temporal, recentemente foi relacionado com os fenômenos de aprendizagem e memória (Ergorul & Eichenbaum, 2004.) e regulação da ansiedade (Bannerman *et al*, 2004). Estando também envolvido na resposta ao estresse e é ativado por vários agentes estressores (Lathe, 2001 *apud* Herman; Muller 2006). O hipocampo possui grande densidade de receptores para glicorticoides (GCs) que, quando ativados, inibem a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Herman;Cullinan, 1997). A exposição a agentes estressores induz o remodelamento de células piramidais hipocampais, bem como uma redução na neurogênese hipocampal (Schoenfeld; Gould, 2011). Essas alterações parecem ser mediadas pelo aumento de corticosteróides que acompanham o evento de estresse, já que a remoção das adrenais previne a neurogênese induzida pelo estresse (Tanapat, *et al* 2001). Estes dados indicam que eventos estressantes teriam efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente mediado pelo aumento de GCs, predispondo o desenvolvimento de depressão. Dessa forma é possível que a exposição crônica a fatores causadores de estresse possa causar alterações morfológicas no hipocampo dos animais. Estudos experimentais em que há restrição alimentar e/ou oferta de dieta palatável alternada vêm sendo utilizados como modelos para provocar distúrbios alimentares. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos tardios do estresse alimentar crônico sobre a morfologia do hipocampo em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesses experimentos o estresse foi caracterizado pela alternância entre restrição alimentar e oferta de uma dieta de alta palatabilidade, conhecida pelo animal, porém o animal não tem acesso ao consumo da dieta. Foram utilizados 20 ratos wistar separados em dois grupos: teste (n=10) e controle (n=10). O Estresse Alimentar teve início a partir do 60º dia de vida e perdurou por um mês, após este tempo eles tiveram um mês descanso onde

nenhum tipo estresse foi aplicado, e só assim os animais foram anestesiados e sacrificados. O material obtido foi processado histologicamente, corados pela técnica histoquímica AgNOR e fotografado no aumento de 400X. De cada imagem foi quantificado o número total de neurônios e de células da glia, o número total de NORs (NNOR) e em seguida realizada uma proporção entre o NNOR pelo número total de neurônios para se obter o número de NOR por neurônio (NNN) e foi verificado o tamanho dos NORs e dos neurônios. Após as mensurações, os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de student ($P > 0,05$).

RESULTADOS

Quanto ao número de neurônios por campo na camada granular do hipocampo, não foi observada diferença ($P > 0,05$, Teste t de Student) entre os dois grupos, entretanto o grupo estresse apresentou maior número por campo de células da glia que o grupo controle (Tabela 1). Quanto aos demais parâmetros avaliados, não houve diferença entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos tardios do estresse alimentar crônico sobre parâmetros histomorfométricos do hipocampo em ratos.

Características	Número de Neurônios	*Número de Neuroglias	Área do Neurônio	NNOR	NNN	Área NOR
Grupo Controle	114,34 ± 23,94	12,41 ± 2,76	56,37 ± 11,71	259,94 ± 45,80	2,81 ± 0,749	4,00 ± 3,10
Grupo Estresse Alimentar	109,45 ± 18,37	13,35 ± 2,85 *	55,96 ± 11,51	261,51 ± 49,97	2,77 ± 0,683	3,85 ± 928
Valor de p	P=0,107	P=0,019	P=0,448	P=0,817	P=0,147	P=0,159
Teste estatístico utilizado	<i>T de Student</i>	<i>T de Student</i>	<i>T de Student</i>	<i>T de Student</i>	<i>T de Student</i>	<i>T de Student</i>

DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizado um modelo experimental proposto para o estudo do “binge alimentar”. Nesse modelo, períodos alternados de oferta de alimento, restrição alimentar e oferta de alimento conhecidamente palatável, mas sem acesso ao consumo pode ser considerado um fator estressante uma vez que eleva os níveis de corticosterona, um glicocorticoide primário (Hagan et al, 2002; Cifani et al, 2009). Além disso, o período de jejum imposto ao animal pode também ter elevado os níveis de corticosterona, uma vez que restrição alimentar é conhecida por aumentar os níveis deste glicocorticoide (Jahng, 2007). Alguns estudos apontam que o estresse é um fenômeno inversamente proporcional a síntese de novos neurônios (Schoenfeld; Gould, 2011 ; Mineur; Belzung; Crusio, 2007) e que a inibição da neurogênese no giro denteado do hipocampo durante a incidência de estresse é mediada pela liberação de GCs pelas glândulas supra-renais (SAPOLSKI et al, 1990; Tanapat et al, 2001). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que os animais submetidos ao mesmo tipo de estresse do presente estudo apresentaram uma maior densidade neuronal e uma menor densidade neuroglial que o grupo controle (Miguel, 2013). Esses resultados foram encontrados imediatamente a cessação do estresse. No presente estudo, as observações aconteceram 30 dias após a cessação do estresse alimentar encontrando resultados diferentes dos verificados imediatamente após o incidência de estresse, com a densidade neuronal semelhante ao controle e aumento da densidade neuroglial. Apesar de todas as evidências levarem a crer que o estresse produz alterações fisiológicas que inibem a neurogênese, outros estudos também verificaram que alguns tipos de estresse falham em inibir a neurogênese (Hanson, Nemeroff; Owens, 2011). Durante a exposição ao estresse, os animais passaram por períodos de restrição alimentar alternada a oferta do alimento palatável. Estudos verificaram que a restrição dietética apresenta um efeito neuroprotetor contra danos excitotóxicos para o cérebro onde

esse efeito neuroprotetor é consequência do aumento da expressão de Fator Neurotrófico Cérebro Derivado (BDNF) (Bruce-keller et al, 1999; Duan; Guo; Mattson, 2001; Sharma; KAUR, 2005). O BDNF é conhecido pelo seu efeito neuroestimulante, cuja ação faz com que as novas células geradas se diferenciem em neurônios (Cameron et al, 1998). Além destes estudos, Kurmar et al (2009) observaram que esta restrição dietética também protege os neurônios contra os efeitos da pilocarpina, um composto químico utilizado para induzir ataques epiléticos e que consequentemente diminui a intensidade da neurogênese, reforçando ainda mais a ideia do jejum como um fator neuroprotetor. É possível que os períodos de jejum aos quais os animais foram submetidos ocasionaram neuroproteção contra possível o aumento transitório dos glicocorticoides e por isso não encontramos alteração na densidade neuronal. Além disso, a inserção do pote tampado com dieta palatável, funcionou como estímulo alimentar visual e olfatório, levando o animal a explorar o objeto, na tentativa de acessar o alimento palatável e receber sua recompensa alimentar. Estudos demonstraram que atividade exploratória e ambiente enriquecido se correlacionam positivamente com a neurogênese e a plasticidade do hipocampo (Freund et al, 20015) e atenuam os danos a ativação microglial (Piazza et al, 2014). Estudos demonstraram que muitos novos neurônios granulares morrem durante a primeira semana de vida e que, muitos dias após a injeção de BDNF, os novos neurônios apresentam uma curta sobrevivência (Brandt et al., 2003; Hayes; Nowakowski, 2002). É possível que o aumento da densidade neuronal observado imediatamente após a incidência do estresse (Miguel, 2013), mas não no presente estudo, seja devido a curta sobrevivência dos novos neurônios, que possivelmente sofreram apoptose e a densidade neuronal voltou ao padrão semelhante ao grupo controle. No presente trabalho foi observado um aumento nas células da glia, diferente dos resultados encontrados por Miguel (2013) que encontrou uma redução da densidade neuroglial. As células gliais mais abundantes são os astrócitos, que fornecem suporte nutricional e estrutural para os neurônios, participam funcionalmente da barreira hemato-encefálica e fornecem fatores tróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios (Volterra ; Meldolesi, 2005; Stipursky et al, 2010,2011,2012b). Foi sugerido um efeito homeostático para regular a taxa de sobrevivência dos novos neurônios, possivelmente via competição por fatores tróficos (Tanapat et al 1999; Tanapat et al 2001; Snyder et al 2009). Quando ocorre morte do neurônio, pode haver uma hipertrofia e até mesmo o aumento no número de células da glia, causado por mitose de astrócitos maduros (Kiernan,2003) . É possível que os neurônios que sofreram apoptose ocasionaram o aumento de células microgiais reativas levando a maior densidade neuroglial. Há evidências que, na proliferação celular, a quantidade de NORs, aumenta progressivamente a partir da fase G1 precoce, atinge um valor máximo na fase S e permanece constante até a fase G2 tardia. Constatou-se inclusive que a quantidade de AgNORs está intimamente relacionada com a rapidez da proliferação celular (Derenzini, et al 1990). Esses achados podem explicar o fato de ser encontrada nenhuma alteração nos número de NORs entre os grupo estudados, uma vez que não houve aumento no número de neurônios.

CONCLUSÕES

O estresse alimentar é capaz de alterar a citoarquitetura do giro dentado do hipocampo, levando a alterações encontradas mesmo após cessar a incidência do mesmo. Várias hipóteses sobre a possível explicação do aumento da glia foram levantadas, como por exemplo a menor sobrevivência dos neurônios ocasionando o aumento da glia. Entretanto, mais estudos, utilizando técnicas mais específicas, como a imunohistoquímica com a marcação de BrdU, um marcador celular que são incorporados por células que estão

entrando em divisão celular, entre outras técnicas, afim de esclarecer quais os motivos que levaram a essas alterações.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/UFPE, Departamento de Anatomia do CAV/UFPE, a minha orientadora, Lisiane Oliveira e aos colegas do nosso grupo de pesquisa, pela oportunidade e incentivo a pesquisa e ao Professor Francisco Amanajás pelo apoio em seu laboratório.

REFERÊNCIAS

- Bannerman, D. M. et al. 2004. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, v.28, n.3, p.273-83.
- Brandt, M.D. et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, v.24 n.3, p.603-13, 2003
- Bruce-keller, A.J., Umberger, G., Mcfall, R. & Mattson, M.P.1999. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Annals of Neurology*, v. 45, p. 8-15.
- Cameron, H.A.; Hazel, T.G. & McKay, R.D. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *Journal of Neurobiology*, v. 36, p. 287-306.
- Cifani, C. et al. 2009. A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and mizolam. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 204, n.1, p.113-25.
- Derenzini, M. et al., 1998. Nucleolar function and size in cancer cells, *Am J Pathol*, v.152, n.5, p. 1291-7.
- Derenzini, M. & Ploton, D. 1991. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol*, v.32, p.149-92.
- Derenzini, M. et al. 2000. The AgNORs. *Micron*, v.31, n.2, p.117-20.
- Derenzini, M., Pession, A. & TRERE, D. 1990. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells, *Lab Invest*, v.63, n.1, p.137-40.
- Duan, W., Guo, Z. & Mattson, M.P.2001. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *Journal of Neurochemical*. v. 76, p. 619-626.
- Egorul, C. & Eichenbaum, H. 2004. The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn Mem*, v.11, n.4, p.397-405.
- Freund, J. et al. 2015. Association between exploratory activity and social individuality in genetically identical mice living in the same enriched environment. *Euroscience*.
- Hagan, M.M. et al.2002. A new animal model of binge eating: key synergistic role of past caloric restriction and stress. *Physiol Behav*, v.77, n.1, p.45-54.
- Hanson, N. D., Nemeroff C. B. & Owens M. J. 2011. Lithium, but not fluoxetine or the corticotropin-releasing factor receptor 1 receptor antagonist R121919, increases cell proliferation in the adult dentate gyrus. *J Pharmacol Exp*, v. 337, p.180-6.
- Hayes, N. L. & Nowakowski, R. S. 2002. Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice. *Brain Res Dev Brain Res*, v.134, n.1-2, p.77-85.
- Herman, J. P. & Cullinan W. E.1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, v.20, n.2, p.78-84.
- Herman, J.P. & Mueller, N.K. 2006. Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behav Brain Res*, v.174, n.2, p-215-24.
- Jahng, J. 2007. "Chronic Food Restriction in Young Rats Results in Depression- and Anxiety-Like Behaviors with Decreased Expression of Serotonin Reuptake Transporter," *Brain Research*, v. 1150, p.100-107.
- Kiernan, J. A. 2003. *Neuroanatomia humana de BARR*. 7ª ed. Barueri, SP: Manole, v. 2, p.16-41.
- Lathe R. 2001. Hormone and hippocampus. *J Endocrinol*. v.169, p.205-31.
- Miguel R. D. S. 2013. Efeitos do estresse alimentar crônico sobre a morfometria e a expressão de regiões organizadoras de nucléolos em hipocampus de ratos adultos. Vitória de Santo Antão. 26 f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-Centro acadêmico de vitória.
- Mineur, Y.S., Belzung, C. & Crusio, W.E. 2007. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience*, v. 150, p. 251-259.
- Piazza, F.V. et al. 2014. Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. *Metab Brain Dis*, v.29, n.1, p.93-104.
- Sapolski R. M. et al. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* v.10, n.9, p.2897-902.
- Schoenfeld, T. J. & Gould, E. 2011. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol*, v.233, n.1, p.12-21.
- Snyder, J. S. et al. 2009. The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells, *Hippocampus*.
- Stipursky J. et al. 2012 b. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. *Neurochem*.
- Stipursky J., et al. 2011. Neuron-glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci*.
- Stipursky, J. et al. 2010 Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: ULRICH, A.H. (Org.). *Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy*. Springer, v.1, p.145-164.
- Tanapat, P. et al. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, v.19, n.14, p.5792-801.
- Tanapat, P.; et al. 2001. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol*, v.437, n.4, p.496-504.
- Volterra, A. & Meldolesi, J.2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. v.6, n. 8, p.626-40.