

# EFEITOS DO ESTRESSE ALIMENTAR CRÔNICO SOBRE O VOLUME NUCLEAR E DO CORPO CELULAR DAS CÉLULAS DE PURKINJE DO CEREBELO DE RATOS WISTAR

Iago Alves Miranda Santos<sup>1</sup> ; Lisiane dos Santos Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Nutrição – CAV – UFPE; E-mail: iagomiranda\_@hotmail.com, <sup>2</sup>Docente do Núcleo de Enfermagem – CAV – UFPE; E-mail: lisianenutricao@yahoo.com.br.

**Sumário:** O cerebelo possui uma histoarquitetura caracterizada por três camadas: Molecular, Purkinje e Granulosa. Na camada de purkinje, predominam os neurônios de purkinje que recebem níveis de glicocorticoides, podem reduzir a neurogênese. Modelos experimentais em que ocorre estimulação sensorial, mas sem acesso a uma dieta palatável pode ser considerado um fator estressante, pois eleva o nível sérico de glicocorticoides. O objetivo deste estudo foi observar os efeitos da exposição crônica ao estresse alimentar sobre a morfologia da camada de Purkinje do cerebelo em ratos. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, esses animais foram divididos em 2 grupos, grupo controle (n=8) e grupo teste (n=8), e submetidos a um modelo de estresse alimentar crônico (exposição ao alimento palatável com ou sem acesso ao consumo, porém com exposição visual e olfativa alternados com períodos de jejum ou repouso), dos 60 aos 90 dias de vida. Foram sacrificados no 91º dia e após a decapitação e remoção do encéfalo, o cerebelo foi dissecado e foram realizados todos os procedimentos histológicos para obter as lâminas histológicas coradas pela técnica de Hematoxilina - Eosina. As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo e clareza de campo, obtendo 20 campos por lâmina de cada camada celular do cerebelo. As imagens foram analisadas por um software. Foi observado que o modelo de estresse alimentar, não foi capaz de promover alterações morfológicas visíveis em método de coloração com Hematoxilina - Eosina nas células de purkinje dos cerebelos dos animais em estudos.

**Palavras-chave:** Cerebelo, Células de Purkinje, Estresse Alimentar.

## INTRODUÇÃO

Durante todo curso vital, somos expostos a várias situações consideradas como estímulo positivo que promovem o desenvolvimento do organismo. Porém, também nos deparamos com eventos que podem gerar um estado de estresse (Gazzaniga & Heatherton, 2007). Segundo Fraser et al. (1975), um animal está em estado de estresse quando se faz necessário alterar de maneira extrema sua fisiologia para que haja adaptação aos aspectos adversos que o meio proporciona. Essa adaptação envolve várias respostas neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais que possui a finalidade de manter o equilíbrio (Barnett & Hemsworth, 1990). Seyle foi o primeiro a descrever em 1936 uma resposta generalizada, marcada pelo estímulo do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), o eixo responsável pela ativação do estresse. Estudos afirmam que o Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser alterado pela influência do estresse através de suas mudanças fisiológicas nos níveis de glicocorticoides (Loures, Sant Anna et al., 2002). Alterações nos níveis de glicocorticoides, causadas pela ação do estresse, podem interferir na neurogênese em algumas regiões do SNC como, por exemplo, o hipocampo (Heale, Vanderwolf et al., 1994). A Neurogênese é o processo de produção de novos neurônios nas regiões do

cérebro (Parent, 2003). Além do hipocampo, uma das estruturas que também foi observado neurogênese, foi o cerebelo (Carletti e Rossi, 2008), sendo recentemente observada no cerebelo de mamíferos, como coelhos (Ponti, Crociara et al., 2010). O cerebelo é dotado de uma arquitetura celular caracterizada por três camadas celulares: molecular, Purkinje e granular (Van Welie, Smith et al., 2011). As células de Purkinje são elementos dominantes do processo de informação cerebelar e podem apresentar alterações degenerativas podendo ser observadas por métodos de coloração padrão como o Hematoxilina-Eosina (Rogers J, et al., 1984). Para uma melhor compreensão, as células de Purkinje têm grande relevância, por serem as células que mais recebem sinapses no SNC, podendo receber até 200 mil contatos sinápticos (Annunziato, 1995). Estudos experimentais em que há restrição alimentar e/ou oferta de dieta palatável, alternadas vêm sendo utilizados como modelos para provocar distúrbios alimentares (Hagan, Wauford et al., 2002; Corwin, Avena et al., 2011). O estresse 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, de acordo com os achados de Cifani et al (2009), foi capaz de ativar o eixo HPA, elevando assim, o cortisol na corrente sanguínea. Nessa metodologia o animal recebe estímulos visuais e olfativos de um alimento conhecidamente saboroso, mas o acesso ao consumo dessa dieta não é possível, no entanto a dieta padrão continua acessível. Esses achados demonstraram que a presença do alimento conhecidamente palatável para o animal, mas sem o acesso ao consumo é um fator estressante e que eleva os níveis de corticosterona e alternadamente a períodos de jejum é capaz de provocar o “binge alimentar” (Cifani, Polidori et al., 2009). Por outro lado a restrição proteica também pode ser considerada um fator de estresse, pois ativa o eixo HPA (Garcia-Belenguer, Oliver et al., 1993). A incidência de estresse durante a gestação, em ratos, é capaz de alterar, nos filhotes com 30 dias de vida, a morfologia e a densidade numérica de neurônios cerebelares por afetar ativamente a divisão celular durante o período de estresse (Ulupinar, Yucel et al., 2006). Entretanto pouco se sabe a respeito dos efeitos da incidência de estresse crônico sobre a estrutura deste órgão, principalmente sobre as células de Purkinje. Sabendo que o estresse alimentar é capaz de promover várias alterações comportamentais e fisiológicas, como a elevação de glicocorticoides (Cifani, Polidori et al., 2009), numerosas pesquisas vêm fornecendo dados detalhados sobre a delicada estrutura e organização do cerebelo em mamíferos, em especial sobre as células de Purkinje. O objetivo deste subprojeto é estudar os efeitos da incidência crônica de estresse alimentar sobre o volume nuclear e corpo celular das células de Purkinje do cerebelo de ratos Wistar adultos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, esses animais foram divididos em 2 grupos, grupo controle e grupo teste, e submetidos a um modelo de estresse alimentar crônico, quando completaram 60 dias de vida. Esse modelo de estresse é caracterizado por exposição ao alimento palatável, com períodos de restrição alimentar, porém com exposição visual e olfativa, gerando um estado de estresse no animal. Foram sacrificados no 91º dia. Os animais foram anestesiados e sedados (Xilazina e Cetamina) e em seguida perfundidos com formol neutro tamponado a 10% (NBF). Após a decapitação e remoção do encéfalo, o cerebelo foi dissecado. Em seguida foram realizados todos os procedimentos histológicos para obter as lâminas histológicas coradas pela técnica de Hematoxilina - Eosina (H.E.). As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo e clareza de campo, obtendo 20 campos por lâmina de cada camada celular do cerebelo. As imagens foram analisadas por um software para contagem celular e os resultados foram submetidos ao teste t de student.

## RESULTADOS

Os dados da avaliação microscópica obtidos foram analisados estatisticamente através do teste t de student para as variáveis quantitativas com o intuito de se verificar possíveis diferenças entre os grupos avaliados. Para tanto, foi adotado o nível de significância de 5% ou  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

A análise dos resultados deste trabalho, possivelmente demonstram que o presente modelo de estresse alimentar crônico, não foi capaz de promover alterações morfológicas visíveis através do método de coloração H & E, no volume nuclear e corpos celulares das células de purkinje do cerebelo de ratos *Wistars*. Análises anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, observaram que o presente modelo de estresse alimentar foi capaz de promover alterações a nível de organização celular, com aumento do número de neurônios na camada Granulosa do cerebelo, sem alterações do número de células das camadas Molecular e Purkinje. São escassos na literatura científica estudos relacionando os efeitos do estresse crônico sobre a morfologia do cerebelo, e também estudos sobre alterações morfológicas causadas por modelos de estresse alimentar. Contrário ao que se acreditava à poucos anos atrás, algumas áreas encefálicas são capazes de apresentar neurogênese após o período completo de desenvolvimento, ou seja, na fase adulta. É bem conhecida e estudada a neurogênese adulta no hipocampo (CAMERON et al., 1998) e também encontrada no cerebelo (CARLETTI e ROSSI, 2008), sendo recentemente observada no cerebelo de peixes (DELGADO e SCHMACHTENBERG, 2010) e em coelhos (PONTI, CROCIARA et al., 2010). Sabe-se que a neurogênese é inibida pela liberação de glicocorticóides pelas glândulas suprarrenais (SALPOSKI et al 1990; TANAPAT et al 2001). Sob o estímulo do eixo HPA, os glicocorticóides atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, regulando e sustentando uma grande variedade de funções homeostáticas no organismo além de regular as respostas ao estresse (JONAT et al., 1990; KARIN, 1998). O modelo experimental de estresse alimentar utilizado nesse trabalho (CIFANI et al., 2009), é caracterizado por elevar os níveis de glicocorticoide nos primeiros 15 minutos de exposição visual e olfativa à dieta conhecidamente palatável, porém sem acesso ao consumo. Seguindo o raciocínio do que foi exposto, esperava-se que o estresse alimentar promovesse uma redução do número de neurônios, por inibição da síntese de novos neurônios e elevação da apoptose celular. Entretanto observamos um efeito contrário ao esperado. Ulupinar et al (2006) afirmam em seus estudos que, com a elevação dos níveis séricos de corticosterona, a densidade de células de Purkinje aumentam e o volume nuclear diminui em animais estressados. Porém, não encontramos redução no número de neurônios em nenhuma das camada celulares e ainda encontramos a elevação no número de neurônios na camada granulosa. Estudos do nosso grupo de pesquisa, em fase de publicação, com o hipocampo de ratos submetidos a mesma metodologia, também demonstraram aumento de células granulares no giro denteado do hipocampo de ratos submetidos a estresse alimentar (MIGUEL, 2013). Duan et al., (2001), Sharma e Kaur (2005) observaram que a restrição alimentar promove aumento da expressão do Fator Neurotrófico Cérebro Derivado o BDNF que causa um efeito neuroprotetor, aumentando a densidade neuronal (CAMERON et al., 1998). Alterações na morfologia das células de Purkinje podem promover mudanças no metabolismo celular, interferindo de forma global nas funções motoras e cognitivas devido alterações na liberação de neurotransmissores, e conteúdo celular, podendo causar mudanças comportamentais e desordens psiquiátricas (ULUPINAR et al., 2006). É possível que, apesar da submissão ao estresse alimentar, a restrição alimentar imposta pelos períodos de jejum possa ter funcionado como um fator neuroprotetor, protegendo as células de purkinje de alterações e elevando o nível de neurônios na camada granulosa. Além disso, o cerebelo dos roedores, é o local com maior

quantidade de Receptores do fator liberador de corticotrofina tipo-1 (CRFR-1), com expressão predominante nas células de Purkinje. A ligação deste receptor com o seu ligante, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) promove um efeito despolarizante nas células de Purkinje e desempenhando um papel crítico na regulação da sobrevivência neuronal, através da ativação de um certo número de vias de sinalização intracelular, neutralizando os efeitos tóxicos de fatores estressantes, promovendo assim, um possível efeito neuroprotetor (LEZOUALC'H, 2000). Quando os animais se depararam com o desafio do pote fechado com a dieta palatável em seu interior, um estímulo alimentar, onde ele podia visualizar e sentir o aroma de um alimento conhecidamente saboroso, mas não tinha acesso ao consumo, representou um desafio, o qual o animal teria que resolver para obter a sua recompensa, o acesso à dieta palatável, gerando uma situação de estresse. O estresse gerado por esses fatores podem ter estimulado o desenvolvimento da citoarquitetura cerebelar, na camada granulosa, favorecendo o desenvolvimento de habilidades motoras, para que os animais pudessem ser capazes de lidar com o desafio que foram submetidos.

## CONCLUSÕES

O presente modelo de estresse alimentar, possivelmente não é capaz de promover alterações morfológicas visíveis em método de coloração H & E nas células de purkinje dos cerebelos dos animais em estudos. 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

- Cifani, C., C. Polidori, *et al.* A preclinical model of binge eating elicited by yo-yo dieting and stressful exposure to food: effect of sibutramine, fluoxetine, topiramate, and midazolam. Psychopharmacology (Berl), v.204, n.1, May, p.113-25. 2009.
- DUAN, W.; GUO, Z.; MATTSON, M.P. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. Journal of Neurochemical. v. 76, p. 619–626, 2001.
- Garcia-Belenguer, S., C. Oliver, *et al.* Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats. J Neuroendocrinol, v.5, n.6, Dec, p.663-8. 1993.
- Gazzaniga, M. S., & Heatherton, T. F. Ciência psicológica: Mente, cérebro e comportamento. Porto Alegre: Artmed. 2007.
- Lezoualc'h, S. Engert, B. Berning, C. Behl, Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid beta precursor protein and with the suppression of nuclear factor-kappaB. Mol. Endocrinol., 14 (2000), pp. 147–159
- Miguel R. D. S., 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, 2013.
- Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, v.138, Spring, p.32. 1936.
- Ulupinar, E., F. Yucel, *et al.* The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. Neurotoxicol Teratol, v.28, n.1, Jan-Feb, p.86-94. 2006.