



Efeito do estresse crônico na ingestão alimentar e comportamento tipo depressivo em modelo animal

Palavras-chave: ESTRESSE, CAMUNDONGOS, PROTOCOLO UCMS, ANSIEDADE, DEPRESSÃO

Autores(as):

Ana Clara Peressinoto Romero, FEA - UNICAMP

Isabel Sebinelli de Godoy Oriani, FCF - UNICAMP

Levi Nascimento Bellinazzi, FEA - UNICAMP

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior (orientador), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O estresse exerce efeitos prejudiciais em diversas funções celulares por meio do comprometimento das defesas antioxidantes, comprometimento esse o qual é a causa central de muitas doenças, como doenças neurodegenerativas, distúrbios neuropsiquiátricos e depressão induzida por estresse [1, 2, 3]. Apesar de depressão clínica, sintomas depressivos e estresse psicológico serem condições distintas, elas estão intimamente relacionadas entre si: o estresse crônico repetido tem sido associado ao desenvolvimento e manifestação de depressão [4].

Neste trabalho, o estresse foi atingido por meio da aplicação de estressores de baixa intensidade, o que resultou no desenvolvimento de alterações comportamentais nos animais estudados. Essas mudanças comportamentais, em conjunto com alterações neurais e endócrinas, se assemelham àquelas encontradas em indivíduos que sofrem de transtornos depressivos e ansiedade [5, 6].

METODOLOGIA:

Todos os experimentos *in vivo* realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, sob protocolo n. 6370-1/2023. Dezesesseis camundongos BALB/c machos com 8 semanas de idade (peso \approx 17g) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB - UNICAMP).

A indução de fenótipos físicos, comportamentais, bioquímicos e fisiológicos semelhantes aos da depressão em humanos foi feita utilizando o protocolo UCMS de modelo de depressão em camundongos com estresse crônico leve imprevisível (UCMS da sigla em inglês para '*unpredictable chronic mild stress*'). Os animais foram subdivididos em dois grupos ($n = 8$ cada), conforme o tratamento recebido: 1) grupo controle (CT), alojado em grupos de 4 animais por gaiola, em condições de temperatura ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C) e umidade relativa (55 a 65%) controladas, ciclo claro/escuro 12/12h invertido (ciclo escuro das 7h às 19h), e

livre acesso à água e ração; 2) grupo estressado (ST), alojados em gaiolas individuais nas mesmas condições do grupo controle, porém submetidos ao protocolo de estresse.

Os animais do grupo ST foram submetidos a uma programação de estressores psicossociais leves por 10 semanas, sendo eles: estresse social, serragem suja, troca de serragem, gaiola sem serragem, serragem úmida, estresse hídrico, inclinação da gaiola, fezes de rato, estresse de contenção e distúrbio do ciclo claro/escuro. A fim de evitar qualquer possível habituação dos animais aos estressores, foi mantida a imprevisibilidade no protocolo de estresse. Sendo assim, a ordem dos estressores foi variada semanalmente durante o período de exposição ao estresse.

Os animais foram pesados semanalmente para acompanhar o ganho, perda ou manutenção de peso, como possível indicador adicional dos efeitos do estresse crônico. A avaliação do estado da pelagem foi realizada semanalmente como medida do comportamento de limpeza e da motivação do animal para atividades egocêntricas. Sete áreas do corpo do animal (cabeça, pescoço, costas, abdômen, cauda, patas dianteiras e traseiras) receberam pontuação 0 (bom), 0,5 (moderado) ou 1 (ruim), totalizando uma pontuação possível de 0 a 7.

A partir da sétima semana do protocolo UCMS, todos os animais (estressados e controles) foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da atividade auto direcionada e anedonia, sendo eles:

1) Teste exploratório baseado em recompensa: o animal foi colocado em um novo ambiente onde, se explorado, foi recompensado com ração/biscoito. O teste propõe avaliar a motivação do animal para um estímulo palatável, baseado em três dimensões comportamentais: estado de ansiedade e exploração de um novo ambiente, habituação a um ambiente novo e anedonia.

2) Teste de construção de ninho: quadrados de algodão foram colocados na gaiola do animal e após 6 e 24h a construção de um ninho com o algodão foi avaliada por pontuação de 1 a 5. A primeira pontuação (após 6h) fornece uma estimativa da velocidade de construção do ninho; a segunda (após 24h) avalia a qualidade do ninho.

3) Teste de higiene: utilizado como medida quantitativa direta do comportamento de limpeza. Após pulverização de uma solução de sacarose a 10% no dorso do animal, foi medida a latência para iniciar o primeiro comportamento de limpeza, sua frequência e a duração da limpeza.

Na décima semana após início do protocolo UCMS, os animais foram anestesiados com aplicação intraperitoneal de cloridrato de cetamina (300 mg/kg) e cloridrato de xilazina (30 mg/kg); e após inconsciência do animal, a eutanásia foi feita por exsanguinação via punção cardíaca.

O ganho de peso semanal, a ingestão alimentar, o estado da pelagem e os resultados dos testes (exploratório baseado em recompensa, construção de ninho e higiene) foram analisados usando teste t ($p < 0,05$), utilizando o software GraphPad Prism 10.3.0 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

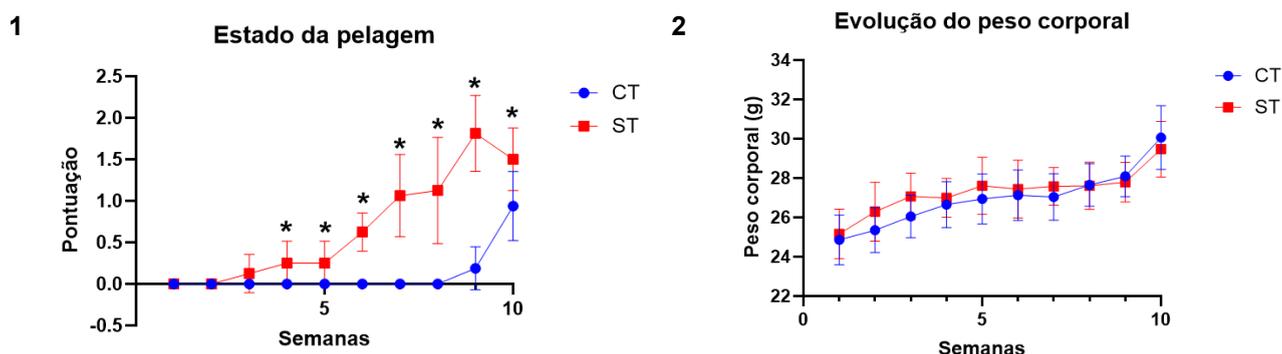
RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dispostos abaixo estão os resultados referentes ao peso corporal, estado da pelagem, ingestão alimentar e testes - exploratório baseado em recompensa, construção de ninho e higiene.

Tabela 1 - Ganho de peso corporal e consumo alimentar dos animais durante as 10 semanas do experimento (n = 8)

Grupos	CT	ST
Peso inicial (g)	24,86 ± 1,27	25,16 ± 1,26
Peso final (g)	30,07 ± 1,62	29,47 ± 1,13
Ganho de peso (g)	5,2 ± 1,22	4,31 ± 1,41
Ingestão alimentar (g)	318,89 ± 22,98 ^a	354,33 ± 45,55 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).



Gráficos 1 e 2 - Efeitos do estresse crônico leve imprevisível (UCMS) no estado físico dos animais. **(1)** O protocolo induziu uma deterioração estatisticamente significativa da pelagem ($p < 0,05$), indicando que houve uma alteração no comportamento de limpeza dos animais do grupo ST. **(2)** Nota-se um ganho geral de peso ao longo do tempo em ambos os grupos. No entanto, não existe diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$).

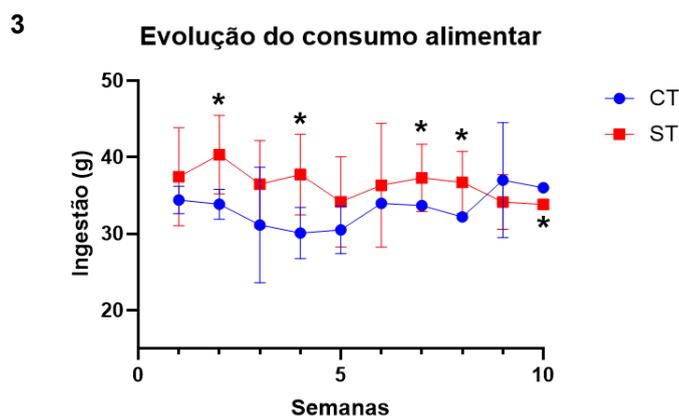
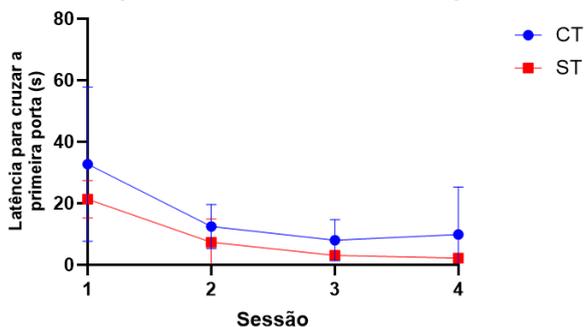


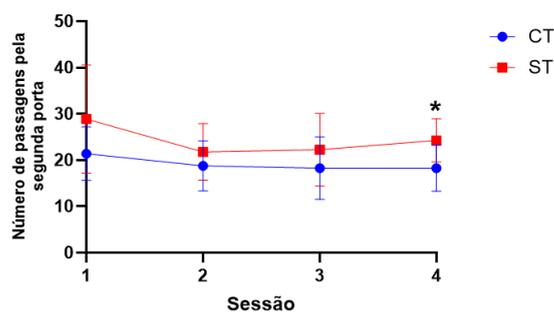
Gráfico 3 - Efeitos do estresse crônico leve imprevisível (UCMS) no consumo alimentar. Foi observado que nas oito primeiras semanas do protocolo o grupo estressado apresentou uma maior ingestão alimentar, sendo que nas últimas duas semanas o grupo controle passou a se alimentar em maior quantidade, sendo

possível verificar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e estressado ($p < 0,05$).

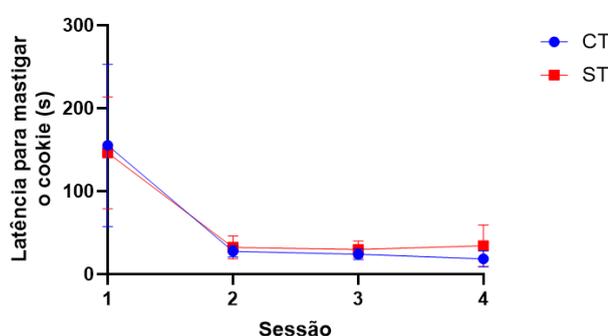
4 Teste exploratório baseado em recompensa



5 Teste exploratório baseado em recompensa

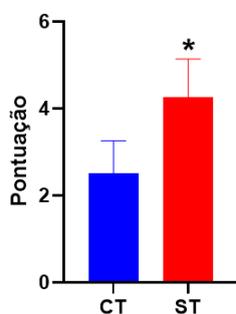


6 Teste exploratório baseado em recompensa

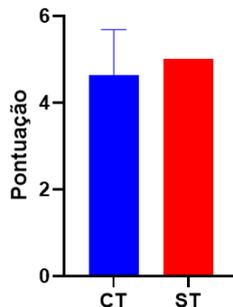


Gráficos 4, 5 e 6 - Efeitos do estresse crônico leve imprevisível (UCMS) no teste exploratório baseado em recompensa. **(4)** Não foi possível observar diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), indicando que o protocolo UCMS não induziu um estado semelhante à ansiedade. **(5)** Nota-se que nas quatro sessões os animais do grupo estressado passaram mais pela segunda porta que os animais do grupo controle, sendo a diferença entre os dois grupos significativa ($p < 0,05$), demonstrando que o UCMS provocou perturbações nos comportamentos locomotor e exploratório dos animais. **(6)** Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$), indicando que o UCMS não foi capaz de provocar anedonia.

7 Teste de construção de ninho - 6 horas



8 Teste de construção de ninho - 24 horas



Gráficos 7 e 8 - Efeitos do estresse crônico leve imprevisível (UCMS) no teste de construção de ninho. **(7)** A diferença entre o grupo controle e o estressado mostrou ser significativa ($p < 0,05$), indicando que o UCMS

afetou a velocidade de construção do ninho. **(8)** Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$), indicando que o UCMS não alterou a qualidade dos ninhos construídos.

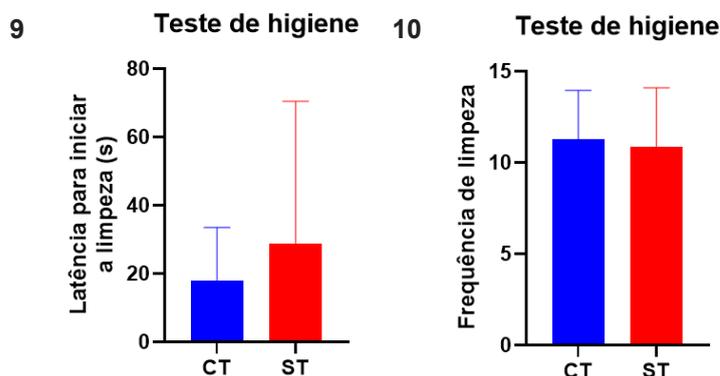


Gráfico 9 e 10 - Efeitos do estresse crônico leve imprevisível (UCMS) no teste de higiene. **(9)** Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$). **(10)** Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

CONCLUSÕES:

A aplicação do protocolo UCMS gerou uma deterioração no estado da pelagem, apesar do teste de higiene indicar que o comportamento de limpeza dos animais submetidos ao UCMS não foi afetado. Ambos os grupos sofreram um aumento de peso, entretanto não foi possível detectar uma diferença no ganho de peso entre os animais controle e estressados. O teste exploratório indica que o UCMS alterou os comportamentos locomotor e exploratório, mas não foi capaz de induzir ansiedade e anedonia nos animais. Já o teste de ninho indica que o grupo ST foi capaz de construir os ninhos mais rapidamente, apesar da qualidade ser a mesma dos ninhos construídos pelo grupo CT.

BIBLIOGRAFIA:

1. Sapolsky, R.M., 2000. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol. Psychiatry* 48, 755–765.
2. Jenner, P., 1991. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 84 (Suppl. 136), 6–15.
3. Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M.A., Uydu, H.A., Bekaroglu, M., Deger, O., 2001. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J. Affect. Disord.* 64, 43–51.
4. Checkley, S., 1996. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br. Med. Bull.* 52, 597–617.
5. SURGET, Alexandre; BELZUNG, Catherine. Unpredictable chronic mild stress in mice. Kalueff AV, LaPorte JL. *Experimental Animal Models in Neurobehavioral Research*. New York, NY: Nova Science, p. 79-112, 2008.
6. NOLLET, Mathieu et al. REM sleep's unique associations with corticosterone regulation, apoptotic pathways, and behavior in chronic stress in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 7, p. 2733-2742, 2019.