ESTRESSE LEVE CRÔNICO IMPREVISÍVEL INDUZ COMPORTAMENTO SEMELHANTE À DEPRESSÃO E PROMOVE ALTERAÇÕES NO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DE RATOS E RATAS WISTAR

Loren Nunes Martins[1], Heloísa Kiminay Oliveira Santos[2], Lorena Tárcila Correia Souza[2], Maria Gabriela Oliveira Coelho[3], Luciano Cardoso Santos[1], Stephanie Carvalho Borges[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil (lnmartins.ppgca@uesc.br)
[2]Graduanda em Enfermagem Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil
[3]Graduanda em Ciências Biológicas Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil

Resumo: O estresse crônico resulta da interação de fatores físicos, emocionais e ambientais, impactando a saúde intestinal e mental. Este estudo avaliou os efeitos do estresse crônico no comportamento e na motilidade gastrointestinal de ratos Wistar submetidos ao protocolo ELCI por seis semanas. Ambos os sexos desenvolveram comportamento depressivo. Contudo, apenas os machos apresentaram atraso no trânsito gastrointestinal. Conclui-se que o trato digestório masculino é mais suscetível a tais impactos.

Palavras-chave: comportamento; depressão; motilidade intestinal.

INTRODUÇÃO

Afetando de maneira significativa a saúde física e mental dos indivíduos (Konturek *et al.*, 2011), o estresse é um fator de risco amplamente reconhecido no desenvolvimento de diversas condições patológicas.

Dentro de um episódio de estresse agudo, em que o efeito estressor ocorre uma única vez e por um curto período de tempo (Atrooz *et al.*, 2021), há a ativação do sistema nervoso simpático e da resposta adrenal, com a sequente liberação de hormônios do estresse, como o cortisol, e seus efeitos podem vir a alterar a produção e secreção de muco e de enzimas gastrointestinais, além de poder retardar a motilidade intestinal. A curto prazo, essa resposta é adaptativa, preparando o organismo para lidar com uma ameaça imediata (Leigh *et al.*, 2023). Sua forma prolongada ou moderada, definida como superior à 1 h de exposição ao estressor, foi observada, em sua maioria, em pessoas com transtorno de estresse pós-traumático, e é descrita como capaz de proporcionar alterações na fisiologia gastrointestinal (Leigh *et al.*, 2023). A longo prazo, o estresse crônico, caracterizado pela repetição de estímulos estressantes por um longo período (Atrooz *et al.*, 2021), verifica a resposta prolongada não somente do corpo, mas também da mente. O resultado disso, é a geração de processos inflamatórios sistêmicos persistentes, que alteram todo o bom funcionamento do intestino, como a integridade da barreira intestinal, contribuindo para a disbiose e para o aumento de permeabilidade intestinal. Ao afetar também o cérebro, problemas como ansiedade, depressão e distúrbios gastrointestinais são exacerbados (Leigh *et al.*, 2023; Lu *et al.*, 2024).

Podendo impactar negativamente e desregular funções vitais como o metabolismo, a digestão de alimentos e a resposta inflamatória do organismo, a literatura afirma efeitos profundos gerados no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Nervoso Entérico (SNE) pelo estresse crônico (Söderholm *et al.*, 2002). Contudo, as diferenças de resposta entre machos e fêmeas foram pouco exploradas até então.

O Eixo Intestino-Cérebro (EIC) representa uma via complexa de comunicação bidirecional entre o Trato Gastrointestinal (TGI) e o SNC. Essa interação é mediada por uma combinação de neurotransmissores, hormônios, peptídeos e sinais inflamatórios. A comunicação entre o cérebro e o intestino desempenha um papel essencial em diversas funções corporais, incluindo a regulação do estresse, comportamento, metabolismo e até mesmo a imunidade (Foster *et al.*, 2017).

Uma rede de neurônios localizada no trato gastrointestinal chamado de "segundo cérebro", constitui o SNE (Vincenzo, Di *et al.*, 2024), e é considerado um dos componentes mais importantes do EIC, podendo influenciar diretamente a saúde mental e física de um indivíduo (Foster *et al.*, 2017). O SNE é uma rede autônoma que constitui uma rede complexa de vários milhões de neurônios e células gliais (Lu *et al.*, 2024) e trabalha concomitantemente ao sistema nervoso central para efetuar suas funções, estreitamente conectado a ele embora possua também ações independentes. É responsável pelo controle do fluxo sanguíneo intestinal, por regular a produção e secreção de enzimas digestivas, motilidade intestinal, absorção de nutrientes, além de manter a integridade da mucosa intestinal (Furness *et al.* 2014), quando em homeostase. Sua comunicação com o SNC ocorre através do nervo vago, além de liberar mediadores bioquímicos, como a serotonina, que é produzida predominantemente no intestino e influencia o humor e as respostas emocionais. Este sistema desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase intestinal e na resposta ao estresse. Desequilíbrio ou disfunção do SNE pode levar a implicações graves, levando a transtornos intestinais e psicossomáticos (Russo *et al.*, 2023), como a síndrome do intestino irritável (SII), ansiedade e depressão (Foster *et al.*, 2017).

O estresse, tanto físico quanto psicológico, pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da disbiose (Foster *et al.*, 2017). Classificada como uma alteração no equilíbrio da microbiota intestinal, a disbiose é comumente associada a condições inflamatórias, infecciosas e doenças neuropsiquiátricas (Vincenzo, Di *et al.*, 2024). Pode vir a desencadear a secreção de substâncias antimicrobianas e a alteração do pH e da motilidade intestinal. Esse desequilíbrio não apenas afeta a digestão e a absorção de nutrientes, mas também pode afetar a função do EIC, uma vez que as substâncias produzidas pelas bactérias intestinais, como ácidos graxos de cadeia curta, influenciam a função cerebral e o comportamento (Foster *et al.*, 2017).

Um dos principais mecanismos que une o estresse ao processo inflamatório, o estresse oxidativo, é identificado pelo acúmulo de radicais livres e a falha na homeodinâmica redox do organismo (Sies and Jones 2020; Sies *et al.* 2024). A inflamação crônica, tanto no trato gastrointestinal quanto no sistema nervoso, é amplificada por ele. Em um estado de estresse crônico, o aumento do estresse oxidativo pode ser lesivo às células do SNC e do TGI. Esse dano, por sua vez, pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal, translocando endotoxinas e microrganismos patogênicos do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, exacerbando inflamações e promovendo distúrbios psiquiátricos (Leigh *et al.*, 2023).

O presente estudo contou com modelos animais de estresse que podem ser categorizados como aqueles que envolvem estressores físicos ou psicológicos. O estresse físico envolve danos corporais potencialmente fatais, como o estressor de natação forçada. Já o estresse psicológico envolve questões como a antecipação de dor física, desconforto ou medo, tal como a imobilização do animal (Atrooz *et al.*, 2021; Bhatia *et al.*, 2011).

O objetivo do trabalho foi quantificar e evidenciar os impactos do estresse crônico no comportamento e na velocidade do trânsito gastrointestinal de ratos e ratas Wistar adultos, submetidos ao modelo experimental de depressão promovido pelo protocolo ELCI. O presente estudo também comparou as respostas entre machos e fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com temperatura (22 ± 2 ºC) e luminosidade (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas, com água e ração *ad libitum* separados por 4 e 3 animais em cada caixa. A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA aprovou sob o número 003/25, todos os protocolos experimentais envolvendo a pesquisa, e assegurou que estejam de acordo com os preceitos éticos e de acordo com a legislação vigente em experimentação animal com objetivo de garantir o bem-estar animal.

Os animais (n=7) foram divididos entre os grupos: Controle Macho, ELCI Macho, Controle Fêmea e ELCI Fêmea. O protocolo de Estresse Leve Crônico Imprevisível (ELCI) teve duração de 6 semanas, em que foram aplicados os estressores: privação de água e comida por 24 h, natação em água gelada (4 min a 5 ºC), natação em água quente (4 min a 45 ºC), inversão do ciclo claro/escuro por 24 h e imobilização em cilindro perfurado e transparente por 1 h. Para confirmação da indução do estresse nos animais, foi realizado ao final do protocolo, o Teste de Natação Forçada, como também a Análise do Tempo de Trânsito Gastrointestinal para verificar alteração no tempo de trânsito gastrointestinal.

Para induzir estresse de contenção e imobilidade (Schneider *et al*. 2023), os animais foram colocados em tubos transparentes e perfurados para permitir a ventilação, por 1 hora. O diâmetro dos tubos foi adequado para cada animal a fim de impossibilitar qualquer tentativa de movimentação.

FST (Teste de Natação Forçada). O protocolo foi baseado em Liu e colaboradores (Liu *et al*. 2020),

com adaptações. Os animais foram colocados em um balde (30 cm de largura x 32 cm de altura) com água limpa (25 ± 1°C) até a marca de 20 cm. Os ratos foram aclimatados por 6 min. O comportamento de natação, incluindo luta (tempo positivo) e imobilidade (tempo negativo) foi então registrado. O critério para imobilidade é que o animal permaneça imóvel e flutuando ou faça movimentos leves para manter sua cabeça acima da água. Posteriormente, o tempo de imobilidade registrado foi usado para avaliar o comportamento depressivo de cada rato, sendo que tempo prolongado de imobilidade caracteriza depressão. A água foi trocada após cada teste individual e após a natação, os animais foram secos com toalha e mantidos aquecidos. O protocolo estressor de Natação Forçada com alteração na temperatura da água (4 min a 5°C e 4 min a 45°C) é semelhante a este em quesito de execução, diferindo apenas por não haver contagem de tempo de imobilidade do animal.

Para a análise do trânsito gastrointestinal, 300 µL de uma solução contendo 3 % de Carmin hidro ws 52 % e 0,5 % de etilcelulose (Corantec®, São Paulo, Brasil) diluídos em água foi administrada por gavagem via oral 48 horas antes da eutanásia. Os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água. Nesta análise, é avaliado o tempo (em minutos) que o animal levou para eliminar o primeiro pellet fecal contendo o corante.

Um cronograma randomizado de estresse foi adotado, no qual os animais foram submetidos a um ou dois estressores diariamente contanto que o mesmo estressor não se repetisse por dois dias consecutivos, para garantir a imprevisibilidade do experimento. Os grupos controles não foram expostos a nenhum estressor.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada por meio do programa GraphPad Prism v.8 e os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Após realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os dados passaram por pós-teste T de Student para dados normais e pós-teste de Mann-Whitney para dados não normais. Para as comparações entre grupos de maneira simultânea, foi realizada análise de variância TwoWay ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base no Teste de Natação Forçada, é possível afirmar por meio da análise estatística que a indução ao modelo depressivo aplicado aos grupos estressados ELCI foi confirmado (Figura 1). Os resultados são significativos quanto à comparação entre os grupos Controle e ELCI Macho ($p < 0,01$), e também entre Controle e ELCI Fêmea ($p < 0,05$). Esse aumento no tempo de imobilidade encontrado nos grupos ELCI macho e fêmea é caracterizado como comportamento semelhante à depressão, indicando que ambos os sexos foram afetados pelo modelo de estresse aplicado, uma vez que não houve, nesta análise, diferença significativa entre os sexos, apenas entre os grupos Controle e ELCI.

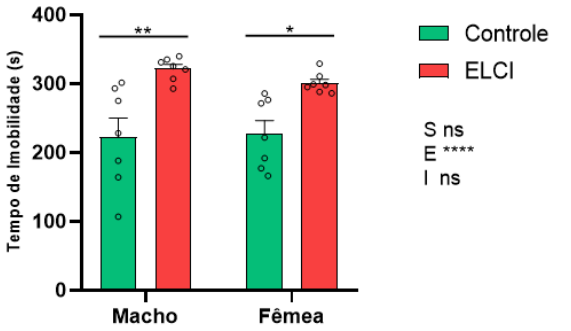


Figura 1. Teste Comportamental de Natação Forçada (FST). Diferenças estatisticamente significativas entre Controle Fêmea vs. ELCI Fêmea * $p < 0,05$; Controle Macho vs. ELCI Macho ** $p < 0,01$. Os dados são representados como média ± erro padrão (n=7). Fatores de variação: (S) Sexo, (E) ELCI e (I) Interação.

Ao avaliar o tempo de trânsito gastrointestinal, verifica-se diferença intersexo. O grupo Controle Macho levou menos tempo para evacuar do que Controle Fêmea ($p < 0,01$). Esses dados apontam que os animais machos saudáveis, de maneira geral, apresentam um menor tempo de trânsito gastrointestinal em comparação com fêmeas saudáveis. Ao observar a resposta nos grupos estressados (ELCI) nota-se que o grupo ELCI Macho foi influenciado pelo protocolo experimental, em que os valores se diferem por mais de 200 minutos, sinalizando diferença estatística significativa em comparação com o grupo Controle ($p < 0,001$) (Figura 2). Entre as fêmeas não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Dessa forma, verifica-se que o sexo influencia a resposta ao estresse.

Ambos os resultados apontados confirmam a teoria de Leigh *et al.* (2023), de que o desequilíbrio promovido pelo estresse crônico pode afetar não apenas o trato gastrointestinal, como a queda da motilidade evidente nos machos estressados, mas também as funções neuropsiquiátricas, uma vez confirmada a indução do comportamento semelhante à depressão em ambos os sexos. Em casos de queda da homeostase intestinal advinda do estresse gerado, a resposta do organismo ao estresse é alterada e leva à disfunção do SNE, gerando estas implicações psicossomáticas (Foster *et al.* 2017; Russo *et al.* 2023).

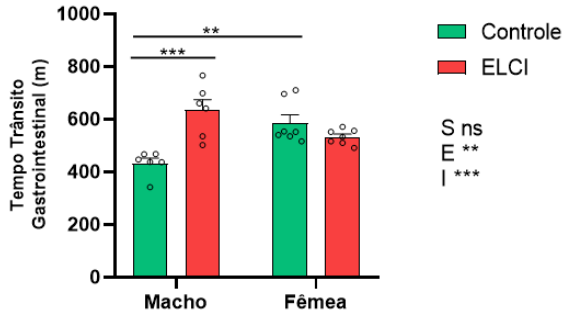


Figura 2. Tempo de Trânsito Gastrointestinal. Diferenças estatisticamente significativas entre Controle Macho vs. Controle Fêmea ** $p < 0,01$; Controle Macho vs. ELCI Macho *** $p < 0,001$. Os dados são representados como média ± erro padrão (n=7). Fatores de variação: (S) Sexo, (E) ELCI e (I) Interação.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam alterações tanto comportamentais quanto no próprio trato gastrointestinal promovidas pelo modelo de Estresse Leve Crônico Imprevisível. Os animais submetidos ao ELCI, tanto machos quanto fêmeas apresentaram comportamento semelhante à depressão. Porém, os animais machos desenvolveram atraso no tempo de trânsito gastrointestinal, enquanto as fêmeas não apresentaram alteração. Dessa forma, concluímos que ambos os sexos são influenciados pelos estressores, porém o trato gastrointestinal dos machos é mais suscetível às complicações promovidas pelo comportamento depressivo. Estes resultados podem fornecer uma base sólida para futuras intervenções terapêuticas, melhorando as abordagens clínicas para o manejo do estresse e suas complicações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, ao CNPq, ao LaBIO, às colegas participantes e aos meus orientadores que tanto contribuíram para que o estudo se concluísse com êxito, a fim de fornecer dados tão bem delimitados e poder agregar à evolução da ciência.

REFERÊNCIAS

Atrooz, F.; Alkadhi, K. A.; Salim, S. Understanding stress: Insights from rodent models. **Current Research in Neurobiology**, v. 2, n. February, p. 100013, 2021.

Bhatia, N. *et al.* Animal models of stroke. **The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology**, v. 2, n. 5, p. 1147–1155, 2011.

Foster, J. A.; Rinaman, L.; Cryan, J. F. Neurobiology of Stress Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. **Neurobiology of Stress**, v. 7, p. 124–136, 2017.

Furness, J. B. *et al.* The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease** p. 39–71, 2014.

Konturek, P.; Brzozowski, T.; Konturek, S. Review article STRESS AND THE GUT: PATHOPHYSIOLOGY, CLINICAL CONSEQUENCES,. n. 6, p. 591–599, 2011.

Leigh, S.-J. *et al.* The impact of acute and chronic stress on gastrointestinal physiology and function: a microbiota-gut-brain axis perspective The stress response: from adaptation to disease. **The Journal of Physiology**, v. 601, p. 4491–4538, 2023.

Lu, T. *et al.* Enteric glial cells contribute to chronic stress-induced alterations in the intestinal microbiota and barrier in rats. **Heliyon**, v. 10, n. 3, p. e24899, 2024.

Russo, S. *et al.* Stress-activated brain-gut circuits disrupt intestinal barrier integrity and social behaviour. **Research square**, 27 out. 2023.

Schneider, K. M. *et al.* The enteric nervous system relays psychological stress to intestinal inflammation. **Cell**, v. 186, n. 13, p. 2823- 2838.e20, 22 jun. 2023.

Sies H and Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 21, p. 363–383, 2020.

Sies H, *et al.*. Fundamentals of redox regulation in biology. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 25, p. 701–719, 2024.

Söderholm, J. D. *et al.* Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1099–1108, 2002.

Vincenzo, F. Di *et al.* **Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review Internal and Emergency Medicine**, v. 19, p. 275–293, 2024.