

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



EFEITOS DA INGESTÃO DO ETANOL DURANTE O DESENVOLVIMENTO, SOBRE A MORFOLOGIA DE NÚCLEOS DA RAFE DE CAMUNDONGOS.

Adriana Tavares da Silva¹, Andréa Vanessa Nascimento Silva², Francisco Gilberto Oliveira³

Resumo:

Quando ingerido durante a gravidez ou amamentação, o álcool (ETOH) pode provocar danos permanentes no sistema nervoso central (SNC) da prole, além de retardar o desenvolvimento do sistema serotoninérgico, alterando respostas fisiológicas e comportamentais. Os núcleos dorsal da rafe (DR) e mediano da rafe (MnR) tem sido apontados como os principais alvos da ação do ETOH durante o desenvolvimento. O DR é associado com a regulação do comportamento emocional, de estresse e ansiedade, na função motora e em tarefas cognitivas complexas. O MnR é associado ao controle do comportamento ingestivo, ritmicidade circadiana e controle do ritmo teta do hipocampo. Objetivou-se investigar os efeitos da exposição crônica do ETOH na morfologia dos núcleos DR e MnR em camundongos procriados por mães submetidas à exposição ao ETOH a 15% (v/v), durante a gestação e/ou lactação. Foram empregados métodos imunistoquímicos e morfometria de área. O consumo de etanol a 15%, por gestantes e/ou lactantes prejudica o desenvolvimento da prole, com redução de área e de imunorreatividade dos neurônios serotoninérgicos do DR e MnR.

Palavras-chave: Etanol. Gravidez. Lactação. Núcleos da rafe. Serotonina.

1. Introdução

O etanol (ETOH) quando utilizado por grávidas, pode provocar efeitos nocivos em muitos aspectos do desenvolvimento fetal, somático e principalmente neurocomportamental (JONES, 2011), desencadeando problemas como ansiedade, depressão, déficits de aprendizado, memória, atenção e coordenação motora (VALENZUELA; PUGLIA; ZUCCA, 2011). Sua ingestão pode retardar severamente o desenvolvimento do sistema serotoninérgico (5-HT) (SLIWOWSKA et al., 2014), provocando redução do número de neurônios que sintetizam serotonina (5-HT) e dos níveis deste neurotransmissor (LO; ZHOU, 2014). Reduções nos níveis de 5-HT pré-natal, retardam a migração e desenvolvimento de neurônios 5-HT (ZHOU et al., 2000)

1 Universidade Regional do Cariri, email: adrianatavarespio@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: andreavanessabiologia@hotmail.com

3 Universidade Regional do Cariri, email: gilberto.oliv@bol.com.br

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



atrasando o início da neurogênese em regiões alvo serotoninérgicas e diminuindo a inervação destas regiões (ZHOU et al., 2005).

Os núcleos dorsal (DR) e Mediano da rafe (MnR) são importantes alvos da ação do ETOH durante o desenvolvimento com reduções do número de neurônios 5-HT bem como de suas projeções (ZHOU et al., 2005). O DR está associado com a regulação do comportamento emocional, relacionado ao estresse e à ansiedade (LOWRY et al., 2005). O MnR tem sido implicado no controle de uma variedade de funções fisiológicas e comportamentais, incluindo comportamento ingestivo, ritmicidade circadiana e controle do ritmo teta do hipocampo (HALE; LOWRY, 2010).

2. Objetivo

Investigar os efeitos da exposição crônica do ETOH na imunorreatividade e morfologia das células 5-HT dos núcleos Dorsal (DR) e Mediano da Rafe (MnR), da prole de camundongos cujas mães foram expostas ao ETOH a 15% (v/v), *ad libitum*, durante a gestação e/ou lactação.

3. Metodologia

Foram utilizados 20 exemplares de camundongos (*Mus musculus*), (10 machos e 10 fêmeas jovens), criados no biotério do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri (URCA). Todos os procedimentos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-URCA), número 00159/2017

3.1 Grupos experimentais e dietas: 1 - Grupo controle (C): Neste grupo as mães receberam alimentação e água *ad libitum* durante todo o período de gestação e aleitamento. 2 - Grupo ETOH gestação, **EtG**: As mães receberam ração *ad libitum* e solução etílica a 15% a partir do momento da confirmação da cópula até o nascimento dos filhotes. Após o nascimento, as mães passaram a receber água filtrada. 3 - Grupo ETOH lactação, **EtL**: As mães receberam ração *ad libitum* e solução etílica a 15% a partir da data de nascimento dos filhotes até o momento do desmame. 4- Grupo ETOH gestação e lactação, **EtGL**: As mães

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



receberam ração *ad libitum* e solução etílica a 15% a partir do momento do acasalamento e durante todo o período de amamentação até o desmame. Após o desmame os filhotes passaram a receber alimentação e água *ad libitum*.

3.2 Perfusão e Microtomia: Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de quetamina a 10% (0,1 ml/100g) e cloridrato de xilazina a 2% (0,05 ml/100g), até o animal atingir o plano anestésico. Posteriormente perfundidos inicialmente com 250ml de solução salina a 0,9% em tampão fostato 0,1M, pH 7,4 (TF), acrescida com heparina (Parinex, Hipolabor, 2ml/1000 ml de solução salina). Posteriormente, os encéfalos foram lavados com TF e colocados em soluções crescentes de sacarose a 10, 20 e 30% em TF, até que houvesse a completa difusão. Depois foram cortados em um criostato (LUPETEC, CM 2850), obtendo-se cortes coronais de 30 μ m.

3.3 Imunoistoquímica para 5-HT: Os cortes foram lavados (cinco lavagens de 5 minutos) em TF em agitador orbital e posteriormente foram submetidas ao pré-tratamento para abolição de artefatos e recuperação de antigenicidade, com boridreto de sódio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em TF por 20 minutos. Na sequência, foram incubados em BSA 10%, diluído em TF 0,1M, pH 7,4, contendo Triton X-100 0,4% durante 60 minutos. Logo em seguida, os cortes foram colocados em contato com o anticorpo primário específico diluído em TF contendo Triton X-100 a 0,4% com BSA a 2%, overnight (25°C) sob agitação constante, automática. Ao fim deste período, os cortes foram submetidos a cinco lavagens de 5 min. cada, e em seguida foram colocados em contato com o anticorpo secundário biotinilado com Triton X-100 a 0,4% por 90 minutos à temperatura ambiente, sob agitação lenta, em agitador. Em seguida os cortes foram submetidos a cinco lavagens de 5 min. cada, e colocados na solução do complexo avidina-biotina-HRP (Protocolo ABC, Kit elite da Vector) em Triton X-100 a 0,4%, contendo NaCl. Para visualizar a reação, as secções foram postas em meio contendo H₂O₂, como substrato, e DAB (3,3',4,4'-tetrahidrocloro-diaminobenzidina) a 2,5% diluída em TF, como cromógeno, por 15min. Após a reação imunoistoquímica, os cortes foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas com gelatina-alúmen-cromo (VETEC®), após secas

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



tratadas em tetróxido de ósmio a 0,05% por 30s. Desidratadas e diafanizadas em xilol.

3.4 Obtenção das imagens e morfometria: As imagens foram feitas das secções coronais dos encéfalos, utilizando um microscópio ótico, (Nikon ECLIPSE Ni) acoplado a uma videocâmera digital (Nikon DS-Ri) conectada a um computador instalado com o software NIS. Foi utilizado o software NIS ELEMENTS AR para selecionar as células e medir a área das células de todos os cortes que apresentavam o núcleo dorsal da rafe (DR) e o núcleo mediano da rafe (MnR).

3.5 Análise estatística: Para todas as análises utilizou-se o *software GraphPad Prism 6.0*, o teste de *Bonferroni* e teste 't' *post hoc*. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi 0,05 ($p < 0,05$). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média.

4. Resultados

As áreas de células 5-HT das diferentes subdivisões do DR apresentaram reduções significativas para os grupos alcoólicos em relação ao grupo CL. A parte lateral do núcleo dorsal da rafe (DRL), dos grupos EtL e EtGL apresentaram diminuição da área de células 5-HT, ambos com ($p < 0,001$) em relação ao CL. O grupo EtG não foi significativo. Tanto a parte dorsal do núcleo dorsal da rafe (DRD), quanto a parte ventral (DRV) apresentaram diminuição da área total de células 5-HT em todos os grupos alcoólicos em relação ao CL. Tanto no DRD como no DRV o grupo EtG apresentou ($p < 0,001$), EtL e EtGL ($p \leq 0,0001$) em relação ao CL. A parte interfascicular do núcleo dorsal da rafe (DRI), apresentou o EtL ($p < 0,05$) e EtGL ($p < 0,001$). O núcleo pósterodorsal da rafe (PDR) apresentou redução de área das células 5-HT apenas para os grupos EtL e EtGL ($p < 0,01$) em relação ao CL. As análises referentes a área de células 5-HT do MNR demonstram que apenas os grupos EtL e EtGL apresentaram reduções de área estatisticamente significativas em relação ao CL, sendo EtL ($p < 0,001$) e EtGL ($p < 0,01$).

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



5. Conclusão

O consumo de etanol a 15%, por gestantes e/ou lactantes repercute negativamente sobre a prole, causando prejuízos para o desenvolvimento, com redução de área e de imunorreatividade dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe de camundongos.

6. Referências

1. HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology**, v. 213, p. 243–264, 2011.
2. JONES, K. L. The effects of alcohol on fetal development. **Birth Defects Research**, v. 93, p. 3-11. 2011.
3. LO, C. L.; ZHOU, F. C. Environmental alterations of epigenetics prior to the birth. **Int. Rev. Neurobiol**, v.115, p.1-49, 2014.
4. LOWRY, C. A.; JOHNSON, P.L.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J.; SHEKHAR, A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress**, v. 8, p. 233–246, 2005.
5. SLIWOWSKA, J. H.; SONG, H. J.; BODNAR, T.; WEINBERG, J. Prenatal alcohol exposure results in long-term serotonin neuron deficits in female rats: modulatory role of ovarian steroids. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.38, p.152–160, 2014.
6. VALENZUELA, C. F.; PUGLIA, M. P.; ZUCCA, S. Focus on: neurotransmitter systems. **Alcoh. Res. Heal**, v. 34, n. 1, p. 106-120, 2011.
7. ZHOU, F. C.; SARI, Y.; POWROZEK, T. A. Fetal alcohol exposure reduces serotonin innervation and compromises development of the forebrain along the serotonergic pathway. **Alcoh. Clin. Exp. Res**, v.29, p.141–149, 2005.
8. ZHOU, F. C.; SARI, Y, ZHANG, J. K. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain, **Brain Res. Dev. Brain Res**, v.119, p. 33-45, 2000.