



16º Congresso Nacional de Iniciação Científica

TÍTULO: VARIÇÕES NEUROQUÍMICAS DOS NÚCLEOS VESTIBULARES APÓS LABIRINTECTOMIA UNILATERAL EM POMBOS

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: BIOMEDICINA

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE CIDADE DE SÃO PAULO

AUTOR(ES): NICOLE PALOMA DE ASSIS

ORIENTADOR(ES): GERSON BALLESTER, LEIA BERNARDI BAGESTEIRO, RENATO FIGUEIREDO DE SANTANA

COLABORADOR(ES): FELIPE RICARTE DE OLIVEIRA

Realização:

SEMESP

sindicato das mantenedoras de ensino superior



Apoio:

**ENIAC**
Educação Básica e Superior

- 1. Resumo:** Distúrbios do sistema vestibular são epidemiologicamente relevantes como no caso da labirintite. Após uma labirintectomia unilateral (LB) foi avaliado o controle do equilíbrio funcional e modificações histológicas nos núcleos vestibulares do encéfalo de pombos (bípedes) em diferentes períodos de recuperação. Notou-se piora instantânea do equilíbrio, que tendeu a apresentar recuperação com o decorrer do tempo. Variações específicas na expressão de marcadores neuroquímicos como NeuN, CB, GFAP e 5HT2A podem representar variações no número de células presentes nos núcleos ou mudanças plásticas desencadeadas após lesão LB.
- 2. Introdução:** O bipedalismo é a capacidade do indivíduo de se sustentar e se locomover apenas sobre 2 membros. Animais como primatas, aves, alguns lagartos (que possuem a capacidade de correr de forma bípede), são detentores de tal habilidade (1; 2). Esta capacidade demanda de uma complexa citoarquitetura nervosa envolvendo múltiplas regiões sensório-motoras, como visual, proprioceptiva e vestibular, cuja principal função é a manutenção do equilíbrio, postura e locomoção. (3). A partir da aceleração gravitacional ou por deslocamentos da cabeça no espaço, células sensoriais ciliadas presentes no aparelho vestibular são responsáveis pela transdução destes sinais e o sistema vestibular tem capacidade de gerar respostas motoras favoráveis à manutenção do equilíbrio (4; 3). Estas células sensoriais encontram-se nas regiões das ampolas (dos três canais semicirculares) e máculas (utrículo e sáculo), captando assim a aceleração angular e linear da cabeça (5).

Dickamn demonstrou em 1996, que a maioria das aferências provenientes do utrículo e sáculo se projetam para a extensão rostro-caudal dos NV, enquanto que as aferências geradas pelos canais têm demonstrado, em sua maioria, projeções aos NVM e NVL. As projeções provenientes do NVL se conectam ao tálamo que irá aferir para a área 5 de Broadman (somatosensória) onde contribui para a formação da consciência quanto à orientação espacial e movimentação do corpo. Já as fibras do NVM e NVS, trafegam pelos núcleos abducente, troclear e abdutor, pelo Fascículo Medial Longitudinal (FML), afim de coordenar o reflexo vestibuloocular mantendo o olhar fixo quando há a movimentação da cabeça. Neurônios aferentes e eferentes do NVS, NVM e NVD vão através do Pendúnculo Cerebelar Inferior ao núcleo Vestibulocerebelar coordenando o equilíbrio e respostas da periferia. O NVL envia fibras pelo Trato Vestibuloespinal

para a medula, onde irá regular o tônus muscular dos membros axiais, afim de se manter o equilíbrio, e as fibras do NVM que descendem contralateral e ipsilateral ao FML, tem suas terminações na região cervical da medula, onde inervam a musculatura do pescoço para auxiliar a fixação do olhar e o equilíbrio (6).

Animais que possuem a capacidade bípede, como humanos (*Homo sapiens*) e pombos (*Columba livia*), possuem uma grande região do tronco encefálico formada pelo complexo nuclear vestibular (CNV) (7). O CNV é formado por 4 núcleos de células, localizadas posteriormente no tronco encefálico, sendo eles: Núcleo Vestibular Superior, Núcleo Vestibular Medial, Núcleo Vestibular Lateral (em pombos, denominado Complexo de Deiters) e Núcleo Vestibular Descendente (7;8).

Dentre os mediadores químicos presentes no CNV, a serotonina é considerada um importante neuromodulador, apresentado *in vitro*, uma atividade bifásica espontânea de neurônios do NVM, e *in vivo*, apresenta efeitos diferentes em cada NV (9). A proteína Calbindina (CB), uma proteína da família de proteínas ligantes de cálcio (CaBPs: calcium binding proteins) tem sido encontrada na região do nódulo cerebelar e também no CNV. Em ratos, CB parece sofrer modificações na sua expressão após LB unilateral (10).

Além de suas conhecidas funções de sustentação e imunitárias, um número crescente de estudos têm demonstrado que os astrócitos e microglia expressam receptores para a maioria dos neurotransmissores e liberam substâncias neuroativas que mostram a capacidade de modular a atividade neuronal, plasticidade sináptica e o processo inflamatório (11;12).

Alguns marcadores neurais têm sido amplamente utilizados na identificação de populações neuronais específicas em diversas áreas do sistema nervoso central (SNC), assim como o marcador neuronal NeuroN, é um excelente marcador para neurônios do sistema nervoso central e embrionário, sendo inicialmente descrito como marcador de neurônios pós-mitóticos, e tem sido utilizado inclusive para estimar a população de neurônios presentes em determinadas regiões (13). O estudo presente, busca trabalhar na construção de conhecimento mais aprofundado diante do comportamento químico das células nervosas após uma lesão periférica, e comprovar cientificamente um padrão de respostas plásticas. Disfunções periféricas (receptores sensoriais) ou centrais

(núcleos vestibulares) podem gerar síndromes posturais, proprioceptivas e visuais, como quadros patológicos popularmente conhecidos como vertigens, tonturas e labirintites (14).

Em 1824, Flourens aplicava experimentos de labirintectomia unilateral em pombos (*Columba livia*), a fim de entender as regiões funcionais do cérebro, e desta forma, os animais operados, 1 semana depois, apresentaram uma espécie de recuperação do equilíbrio, que fora prejudicado logo após a cirurgia (15). No último século, estudos baseados na labirintectomia unilateral, têm demonstrado, que tal recuperação funcional, é devido a um fenômeno de reorganização do sistema nervoso central, que é conhecido como compensação vestibular e cada vez mais têm contribuído para entender as bases dos mecanismos funcionais e processos neuroplásticos envolvidos (14; 17). Neuroplasticidade é um processo caracterizado por mudanças estruturais e/ou químicas, que ocorrem por estímulo ou lesão. Portanto, compensação vestibular, consiste em mudanças plásticas da circuitaria neuronal do CNV após lesão vestibular periférica (18).

- 3. Objetivos:** Identificar modificações neuroquímicas presentes no CNV, assim como, mudanças em respostas funcionais de reação de equilíbrio após lesões do aparato vestibular por LB unilateral em pombos.
- 4. Métodos:** Foram utilizados 25 pombos (*Columba livia*). Todos animais foram mantidos em gaiolas isoladas dos demais, com alimento e água *ad libitum*. Este protocolo segue as normas e preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBREA) no sentido de evitar e minimizar ao máximo o sofrimento do animal, e o projeto de pesquisa aprovado pelo CEUA – UNICID, conforme PP 13259324. Inicialmente, os animais foram habituados a se manterem em posição ortostática sobre um poleiro móvel por 10 min/dia, durante quatro dias seguidos para se adaptarem ao mesmo. No quinto dia foram submetidos à cirurgia de labirintectomia, que foi realizada da seguinte forma: uma anestesia intramuscular de composição de 6 unidades x 100g do animal de ketamina (relaxante muscular) + 4 unidades x 100g do animal de xilazina (anestésico) é aplicada no animal (uma unidade equivale a 0,01ml); após o efeito da anestesia, com o animal desacordado, ele foi posicionado num estereotáxico de forma que a cabeça fique imóvel; em seguida é realizada a tricotomia da região que ocorrerá o procedimento, lateral esquerda da cabeça; na sequência aplica-se soro fisiológico para o início do corte com o auxílio do bisturi e uma

tesoura, o corte é realizado próximo à região dos olhos até a região abaixo do bico, possibilitando o acesso à região do crânio e do pescoço. Uma pequena porção de músculos da região do pescoço é retirada, para que a calota craniana na região do osso temporal fique exposta para o início da dissecação com o auxílio de uma broca. Ao visualizar o labirinto vestibular inicia-se o processo de dissecação com uma espátula odontológica para que as regiões de interesse fiquem bem visíveis (utrículo, sáculo e regiões ampulares dos canais), com a região bem visível a lesão no sistema vestibular ocorre na região ampular e macular do aparelho com o auxílio da broca. Por fim, o local foi limpo e fechado com grampo cirúrgico e foi aguardada a recuperação do animal. Na figura 1 é possível observar em vista pósterio-anterior, o labirinto ósseo a ser lesionado.

Os animais retornaram às gaiolas e aguardaram por diferentes períodos de recuperação que foram determinados por 7 dias, 14 dias, 28 dias e 42 dias de recuperação pós cirúrgicos. Foram designados aleatoriamente (sorteio) 5 animais para cada grupo (período de recuperação). Assim, cada uma destas datas denominou o grupo por semana (1 semana: 7 dias, 2 semanas: 14 dias, 4 semanas: 28 dias e 6 semanas: 42 dias), ao qual pertenceram 5 animais. Um grupo de 5 animais foi o grupo controle e não sofreu intervenção cirúrgica, sendo apenas habituados, avaliados no poleiro móvel e feita a análise histológica.

O teste de equilíbrio foi realizado sobre o mesmo poleiro móvel acoplado à um transdutor potenciométrico e cada animal teve 3 tentativas para a aquisição dos dados com duração do tempo em que o animal permanecesse no poleiro ou até o animal se estabilizar neste (com variação mínima de deslocamento angular).

O sistema utilizado para avaliar a manutenção do equilíbrio dos pombos foi um sistema constituído por um transdutor potenciométrico (para monitoramento do deslocamento angular da manutenção do equilíbrio na base de apoio do animal, ou seja, o poleiro), fonte de alimentação e um condicionador de sinais em conjunto com uma placa de aquisição de dados (conversor A/D - National Instruments USB-6009) via USB conectado a um computador portátil. Um diagrama desse esquema é ilustrado na Figura 2.

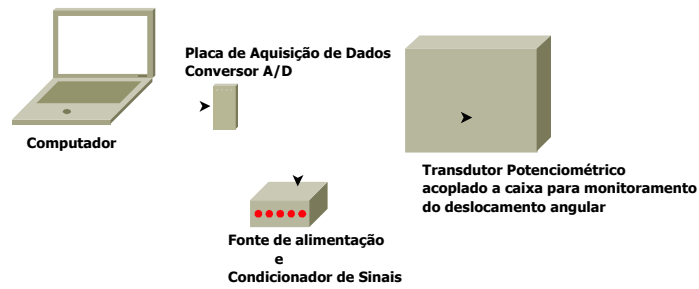


Figura 2: Sistema utilizado na avaliação do controle de equilíbrio.

Para realização de análise histológica, no mesmo dia do teste de equilíbrio, todos animais foram sacrificados por perfusão intracardíaca com solução salina a 0,75%, seus encéfalos fixados por paraformaldeído a 4% e crioprotetidos por solução de sacarose 30%. Após este período, os encéfalos foram seccionados em Criostato (LEICA –MODELO: CM3050S) a 40µm e os cortes divididos em seções e incubados por imunohistoquímica contra os seguintes anticorpos: antígeno nuclear neuronal (NeuN - SIGMA); proteína ligante de cálcio calbindina (CB - SIGMA); proteína ácida fibrilar glial (GFAP - SIGMA) e subunidade 2A do receptor de serotonina (5HT2A - ImmunoStar); em concentrações que variaram de 1:250 a 1:2000 diluídos em solução de Tampão Fosfato (PB) 0,1M + 0,3% Triton X-100 contendo soro normal e à temperatura ambiente por 24 horas. Após esta incubação os cortes foram lavados em Tampão Fosfato (PB) 0,1M e incubados novamente em solução contendo anticorpo secundário que reconhece as imunoglobulinas dos animais utilizados na fabricação do anticorpo primário (exemplo: anticorpo de cavalo que reconhece imunoglobulinas de rato). As concentrações de incubação do anticorpo secundário foram de 1:250, por 1 hora à temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados e em seguida incubados em solução contendo complexo avidina-biotina (ABC kit Elite – Vector Laboratories) por um período de 1 hora à temperatura ambiente. A reação foi visualizada pelo método da peroxidase utilizando PB 0,1M com 3,3' - diaminobenzidina concentrado a 0,05 % (DAB - SIGMA). Os cortes foram montados em lâmina, intensificados por solução de 0,05% de tetróxido de ósmio e cobertos com lamínula. Os cortes marcados com anticorpo contra NN e 5HT2Ar foram analisados por contagem de células nos núcleos vestibulares enquanto os cortes marcados com anticorpo contra CB e GFAP foram analisados pela exposição de densidade dos núcleos vestibulares. Em ambos casos serão utilizados câmera OPTRONICS™ e software MagnaFire™ para obtenção das

imagens dos tecidos, e o programa ImageJ (National Institutes of Health - 2004), para obtenção dos dados de contagem de célula e exposição de densidade.

5. Desenvolvimento: Os animais do grupo controle foram submetidos a um período de adaptação em poleiro móvel por quatro dias seguidos e no 5º dia, foram submetidos a teste do equilíbrio em poleiro móvel acoplado a um potenciômetro. Os animais dos grupos 1S, 2S, 4S e 6S foram submetidos a um treinamento em poleiro móvel por quatro dias e no quinto dia foram submetidos a LB e, após o período de recuperação de cada grupo, os animais tiveram seu equilíbrio testado e foram perfundidos para a realização de imunohistoquímica nos encéfalos. Foi realizada análise histológica, cujo foi analisada a relação das médias dos resultados de contagem e densidade dos núcleos vestibulares conforme o anticorpo utilizado, ao qual foram obtidos os gráficos apresentados.

6. Resultados: Foram realizados todos os processos metodológicos para obtenção de dados em tempo hábil, e possibilitou a análise dos mesmos.

A figura 3 apresenta um pombo se equilibrando em nossa caixa de acrílico com poleiro móvel, no qual foi acoplado um potenciômetro calibrado a identificar a rotação do poleiro. A observação dos animais revelou alteração postural com inclinação da cabeça logo após a labirintectomia (figura 4).



Figura 3: Animal sobre o poleiro móvel do estudo.



Figura 4 - Animal 2 semanas lesionado

A tabela 2 mostra as massas dos grupos testados até o momento na ocasião da cirurgia e na perfusão, com Média \pm desvio padrão.

Tabela 1: Grupos de animais testados e seus respectivos pesos.

Grupo	N	Peso Cirurgia (g)	Peso Perfusão (g)
1S	4	298,8 ± 39,3	303,8 ± 20,2
2S	5	285,0 ± 27,8	312,0 ± 47,2
4S	4	297,5 ± 22,6	316,3 ± 27,8
6S	5	282,0 ± 32,1	271,0 ± 45,5
Controle	4	X	298,8 ± 25,3

Os animais apresentaram, logo após a cirurgia, aumento do deslocamento rotacional do poleiro necessário para realizar o ajuste e equilíbrio. Ao longo do tempo, os deslocamentos necessários tenderam a ser normalizados, ficando próximos aos deslocamentos apresentados pelo grupo controle.

O gráfico 1 indica a avaliação de equilíbrio em pombos controle e em pombos após labirintectomia unilateral em diferentes períodos de recuperação. A barra representa o deslocamento angular do poleiro necessário até alcançar equilíbrio. Assim, quanto maior a barra vertical, pior o equilíbrio e, logo após a cirurgia podemos notar piora das reações de equilíbrio e a recuperação funcional ao longo das semanas. (Gráfico 1).

Tabela 2- Amplitude máxima dos deslocamentos angulares dos grupos testados

Grupo	Deslocamento (°)
1 semana	1790 ± 424
2 semanas	1723 ± 396
4 semanas	1275 ± 305
6 semanas	1004 ± 308
Controle	860 ± 155

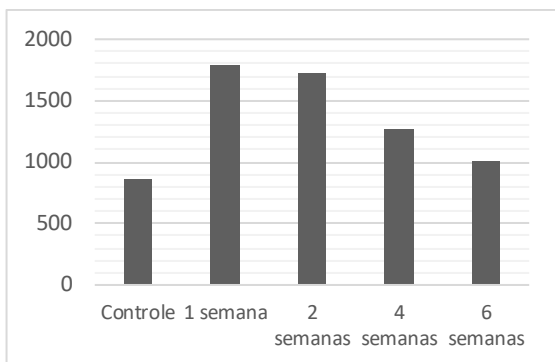


Gráfico 1 - Resultados do teste de equilíbrio do poleiro móvel.

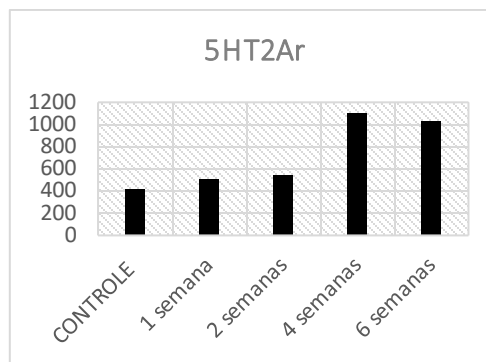


Gráfico 3 - Análise histológica do marcador 5HT2Ar.

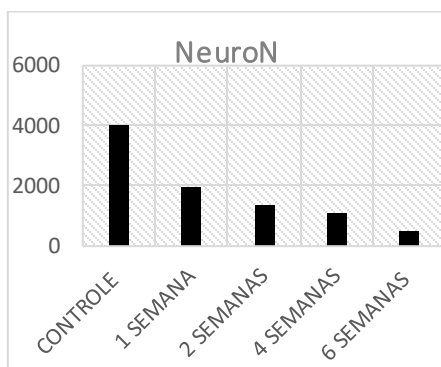


Gráfico 2 - Análise histológica do marcador NeuroN

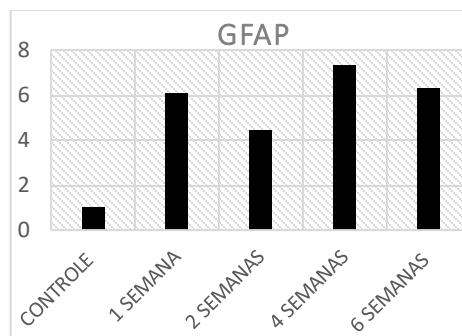


Gráfico 4 - Análise histológica do marcador GFAP.

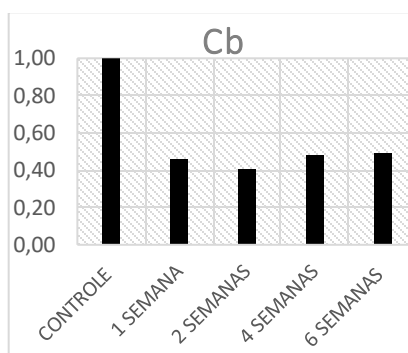


Gráfico 5 - Análise histológica do marcador Cb

Foram observadas possíveis modificações neuroplásticas nos núcleos vestibulares, onde foram analisadas as expressões dos marcadores NeuN, CB, GFAP e 5HT2A. O marcador NeuN apresentou um importante decaimento de sua expressão, o que indica provavelmente, a morte neuronal daquela região, com a ausência do aparato vestibular. 5HT2Ar teve um aumento expressivo dos grupos lesados com relação ao grupo controle, sugerindo uma mudança no grau de expressão de receptores de serotonina,

provavelmente, pelo aumento dos neurotransmissores de serotonina nas fendas sinápticas (19). GFAP apresentou um expressivo aumento dos grupos lesados comparados ao grupo controle, sugerindo neuroplasticidade, uma vez que as células da glia têm uma participação importante no processo de Potenciação de Longa Duração (LTP) (19). Este mesmo aumento populacional das células da glia, foi observado pela primeira vez no estudo de TORRES, *et al* (1999), O marcador de Cb apresentou queda expressiva dos grupos lesados comparados ao controle, mantendo-se nesta média entre os demais grupos, sugerindo esta queda por conta da própria morte neural ou provavelmente uma maior necessidade de Ca^{2+} intracelular seja pela LTP (5HT2Ar); ou pela Apoptose dos neurônios (NeuroN) (19).

7. Considerações Finais: Este foi um trabalho que me proporcionou a experiência de fazer ciência. Mesmo com todos os problemas atuais de nosso país, com o pouco que nos resta, ainda é possível fazer ciência, criar e formar pensadores acadêmicos, e é com este sentimento que termino este meu primeiro projeto de muitos que sonho, acredito e pretendo iniciar e terminar, seguindo a carreira acadêmica.

8. Fontes Consultadas:

1. McN, A. R. (2004). "Bipedal animals, and their differences from humans" Anatomical Society of Great Britain and Ireland 204: 321 - 330.
2. SKOYLES, J. R. (2006). Human balance, the evolution of bipedalism and dysequilibrium syndrome. Medical Hypotheses, 66(6), 1060–1068.
3. PASSETO, M. F.; ROCHA, J. R.; SANTANA, R. F.; TOLEDO, C. A. B. (2012). "Bases neurais do controle postural e o envolvimento da subunidade GLUR1 nas vias vestibulares em aves." Science in Health 3: 139-151.
4. SMITH, P. F. & DARLINGTON, C.L. (1991). "Neurochemical mechanisms of recovery from peripheral vestibular lesions (vestibular compensation)." Brain Research Reviews 16: 117 - 133.
5. ANGELAKI D.E. e CULLEN KE. Vestibular system: The many facets of a multimodal sense. Annual Review of Neuroscience, 31: 125e150, 2008.
6. CORY, M. TITLE: Central Projections of the Vestibular Nuclei. 432KB. Disponível em: < <http://www.melissaecory.com/?portfolio=central-projections-of-the-vestibular-nuclei> > Acesso às 14:10h de 15/03/2016.

7. DICKMAN, J. D. & FANG, Q., (1996). "Diferential Central Projections of Vestibular Afferents in Pigeons." *The Journal Comparative Neurology* 367: 110 - 131.
8. PASSETTO MF, BRITTO LRG, TOLEDO CAB. Mor- phometric analysis of the AMPA type neu- rons in the Deiters vestibular complex of the chick brain. *J Chem Neuroanat* 2008; 35:334–345.
9. MIHLETHALER, M. & VIDAL, P. P. REVIEWS: Neurochemistry of the central vestibular pathways. 20, 24–46 (1995).
10. PARKA, B. R., CHOI, M. A., HONG, S. M. Temporal changes of calbindin expression in the nodulus following unilateral labyrinthectomy in rats. *Neuroscience Letters*, 2013, 555: 47 – 50.
11. TORRES, A. C., VIDAL, P. P. & WAELE, C. D. E. Evidence for a microglial reaction within the vestibular and cochlear nuclei following inner ear lesion in the rat. 92, 1475–1490 (1999).
12. ACHOUR, S. B., PASCUAL, O. Glia: The many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochemistry International*, 2010: 57: 440-445.
13. MULLEN, R.J., BUCK, C.R. and SMITH, A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211.
14. DEVEZE, A.; BERNARD-DEMANZE, L.; XAVIER, F.; LAVIEILLE, J.-P.; ELZIERE, M.; (2013). "Vestibular compensation and vestibular rehabilitation. Currents concepts and new trends." *Neurophysiologie clinique/clinical neurophysiology* 2013: 1 - 9.
15. YILDIRIM FB, SARIKCIOGLU L. "Marie Jean Pierre Flourens (1794–1867): an extraordinary scientist of his time." (2007). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*; 78(8):852.
16. SHAO, M.; POPRATILOFF, A.; HIRSCH, J. C.; PEUSNER, K. D.; (2009) "Presynaptic and postsynaptic ion channel expression in vestibular nuclei neurons after unilateral vestibular deafferentation." *Journal of vestibular research* 19: 191-200.
17. STRAKA, H., VIBERT, N., VIDAL, P.P., MOORE, L.E., DUTIA, M. B. (2005). "Intrinsic membrane properties of vertebrate vestibular neuros: Function, development and Plasticity." *Progress in Neurobiology* 76: 349 - 392.
18. LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios? São Paulo. Artmed, 2003.