



Modelo animal de inalação de etanol no inseto: parâmetros hemodinâmicos sob controle de frequência cardíaca

Palavras-Chave: Etanol, Coração, *Tenebrio molitor*

Autores:

Felipe Hiroshi Kano Inazumi [FEEC]

Nelly Catherine Barbosa Calderon [FEEC]

Adriano Rodrigues de Santana [FEEC]

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (orientador) [FEEC – DEEB – CEB-LabNECC]

Profa. Dra. Rosana Almada Bassani (co-orientadora) [CEB-DEEB- LabNECC]

INTRODUÇÃO:

O uso de insetos tem resultado em grandes contribuições para diversas áreas do conhecimento, envolvendo a pesquisa médica, ambiental e biológica, além de auxiliar no desenvolvimento de novos produtos e sensores. Mais especificamente na área da saúde, os insetos são considerados como excelentes modelos para estudo de doenças humanas, para se estabelecer toxicidade de drogas (ADAMSKI et al., 2019) e estudo de fisiologia devido a sua homologia genética significativa com os mamíferos (WOLF et al., 2006), representando frequentemente uma boa alternativa ao uso experimental de mamíferos.

O uso de etanol (EtOH) na forma inalatória tem aumentado recentemente (LE FOLL & LOHESWARAN, 2014; MACLEAN et al., 2017) com a comercialização de produtos conhecidos como AWOL (*alcohol without liquid*). Estudos mostraram que esta forma de consumo pode produzir no coração efeitos deletérios semelhantes aos da ingestão de EtOH em diferentes espécies, incluído os mamíferos. Por exemplo, cardiomiopatia dilatada e aumento da frequência cardíaca foram relatados após inalação crônica de EtOH em aves e roedores, respectivamente (RISTUCCIA & SPEAR, 2005; KAMRAN et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da inalação aguda de EtOH 70% sob o desempenho do coração do inseto *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) estimulado em frequência constante controlada por um estimulador elétrico. Foi utilizado um software desenvolvido anteriormente (INAZUMI et al. 2022) que permite a estimativa de alguns parâmetros hemodinâmicos como fração de encurtamento (*shortening*) da câmara cardíaca (FS), volume ejetado (VE), débito cardíaco (DC) e fração de ejeção (FE) a partir de vídeos do coração do inseto em atividade. O software está disponível para *download* e execução local em ambiente Jupyter pelo link: <https://github.com/fehiroshii/JupyterNTB>.

METODOLOGIA:

A) Preparação experimental

Foram utilizados besouros *Tenebrio molitor* adultos com 10 a 12 dias de idade e de ambos os sexos (BHATTACHARYA et al., 1970), mantidos em colônia no laboratório. Os insetos foram expostos a um ciclo claro-escuro de 12h e receberam farelo de trigo, cenoura e milho como alimento.

Os animais foram inseridos em uma câmara parcialmente fechada contendo vapor de EtOH líquido 70% e permaneceram na câmara por 1 hora (grupo EtOH). Simultaneamente, outro animal foi

inserido em uma câmara idêntica contendo vapor d'água destilada, onde permaneceu por 1 hora (grupo controle CTR).

Em seguida, os animais foram retirados de suas câmaras e decapitados sob anestesia por resfriamento com gelo. Após remoção cirúrgica de élitros, asas e patas, foi feita uma incisão longitudinal no abdômen e tórax para remover o trato digestivo, glândulas e outras vísceras com a finalidade de expor o coração tubular (vaso dorsal) do inseto (FELICIANO et al., 2011; MARKOU & THEOPHILIDIS, 2000)

A preparação foi aderida ao fundo de uma de câmara de perfusão por meio de uma camada fina de vaselina e colocada em um sistema de microscopia sob iluminação de uma lâmpada de halogênio para possibilitar a visualização e registro da atividade contrátil do coração.

Para estimular o coração do inseto nas frequências de estudo (1,5; 1,7 e 2,0 Hz), foi utilizado um par de eletrodos de platina conectado a um estimulador elétrico. Os eletrodos foram posicionados paralelos ao eixo maior do coração.

B) Gravação dos vídeos

A imagem do coração foi captada por câmera de vídeo (CCD) acoplada à saída lateral de um microscópio (mod. III, Carl Zeiss). O coração foi superfundido (1 ml/min a 24 ± 1 °C) com solução para o *T. molitor*, contendo (em mM): NaCl 80; KCl 5; CaCl₂ 4; sacarose 90; glicose 10; Hepes 20; pH 6,7 (FELICIANO et al., 2011; FIM NETO et al., 2018; MARKOU & THEOPHILIDIS, 2000). A perfusão foi feita por ~30 min, até que a frequência espontânea e amplitude das contrações se estabilizassem.

Vídeos com resolução de 320 x 240 pixels foram gravados utilizando um *software* desenvolvido neste trabalho com uma taxa de aquisição de 30 *fps* (quadros por segundo) durante contração do coração na frequência espontânea (média \pm desvio-padrão da média: CTR: $1,10 \pm 0,08$ Hz; EtOH: $1,16 \pm 0,07$; p = 0,841; teste t de Student, N= 5) e durante estimulação a 1,5; 1,7 e 2,0 Hz. O coração foi estimulado em cada frequência pelo tempo necessário para estabilização das contrações (cerca de 5 min).

C) Análise dos vídeos

Os vídeos gravados foram analisados utilizando um software desenvolvido em Python (INAZUMI et al., 2022), que é capaz de detectar o contorno do vaso dorsal e simular um sólido de revolução a partir do contorno do vaso (figura 1).

O *software* estima volume do sólido de revolução utilizando o método de discos (STEWART, 2013), cuja fórmula é apresentada abaixo

$$V = \pi \int_p^q f(x)^2 dx$$

onde $f(x)$ é a distância do eixo central ao ponto x no contorno, e p e q são, respectivamente, os pontos nos limites superior e inferior do contorno do coração.

Com o volume do coração, o *software* é capaz de fazer cálculos dos parâmetros hemodinâmicos.

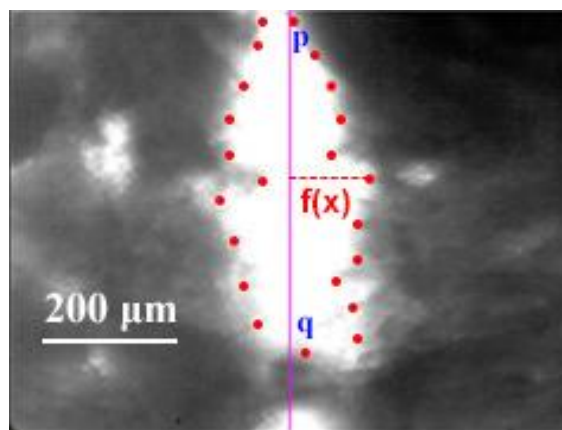


Figura 1 – Imagem do vaso dorsal do *T. molitor* apresentando o eixo de revolução (linha rosa) e alguns pontos do contorno do coração (em vermelho).

VE é calculado como a diferença entre o volume diastólico final (VDF) e o volume sistólico final (VSF).

$$VE = VDF - VSF$$

FE é calculada como a relação percentual de VE e VDF, conforme apresentado pela equação a seguir:

$$FE = \frac{VE}{VDF} \times 100$$

DC é calculado como o produto de VS pela frequência de contrações do coração (f)

$$DC = f \times VS$$

D) Análise Estatística

Os dados obtidos de 5 insetos foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Análise de variância monofatorial para dados pareados foi usada para comparar a F de contração em diferentes frequências estimulatórias em animais controles e expostos a EtOH. Para estudar o efeito de tratamento e da frequência estimulatória sobre os parâmetros cardiovasculares, foi usada análise de variância bifatorial para dados não pareados, seguida de teste de contraste de Bonferroni. Para o processamento dos dados e produção das figuras foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

E) Ética em experimentação animal

Apesar do uso de invertebrados não se enquadrar na lei Arouca (Art. 2º., Lei No. 11.794, de 08-10-2008), o procedimento adotado segue todas as normas internacionais para o uso adequado dos animais

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Quando o tecido cardíaco do inseto é estimulado eletricamente, nem todos os estímulos são seguidos por contrações, ou seja, há alguns escapes de captura. No presente trabalho, a captura foi consideravelmente muito boa. A figura 1 ilustra as frequências (em bpm) nas quais os corações se contraíam em função das frequências estimulatórias aplicadas.

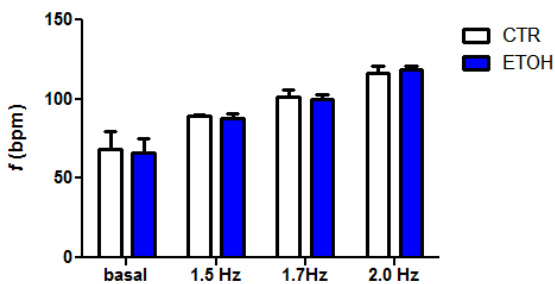


Figura 2 - Frequência de contração do tubo dorsal de *T. molitor* (*f*) expressada em bpm (contrações por minuto) obtidas para as diferentes frequências estimulatórias nos grupos controle (CTR) e expostos a etanol (EtOH) *F* basal: frequência espontânea da preparação. Barras e traços verticais representam médias e desvios-padrões, respectivamente.

A análise de variância monofatorial revelou que não houve diferença significativa entre as frequências de contração nos grupos CTR e EtOH, a qual foi bem próxima da frequência estimulatória.

A figura 3 ilustra os efeitos do EtOH e da frequência estimulatória sobre o vaso dorsal do *T. molitor*. A análise de variâncias bifatorial mostrou que ambos o tratamento com EtOH e o aumento de frequência reduzem significativamente os valores de VE $p < 0,05$, sendo o efeito do tratamento mais pronunciado nas frequências mais altas (Figura 3A).

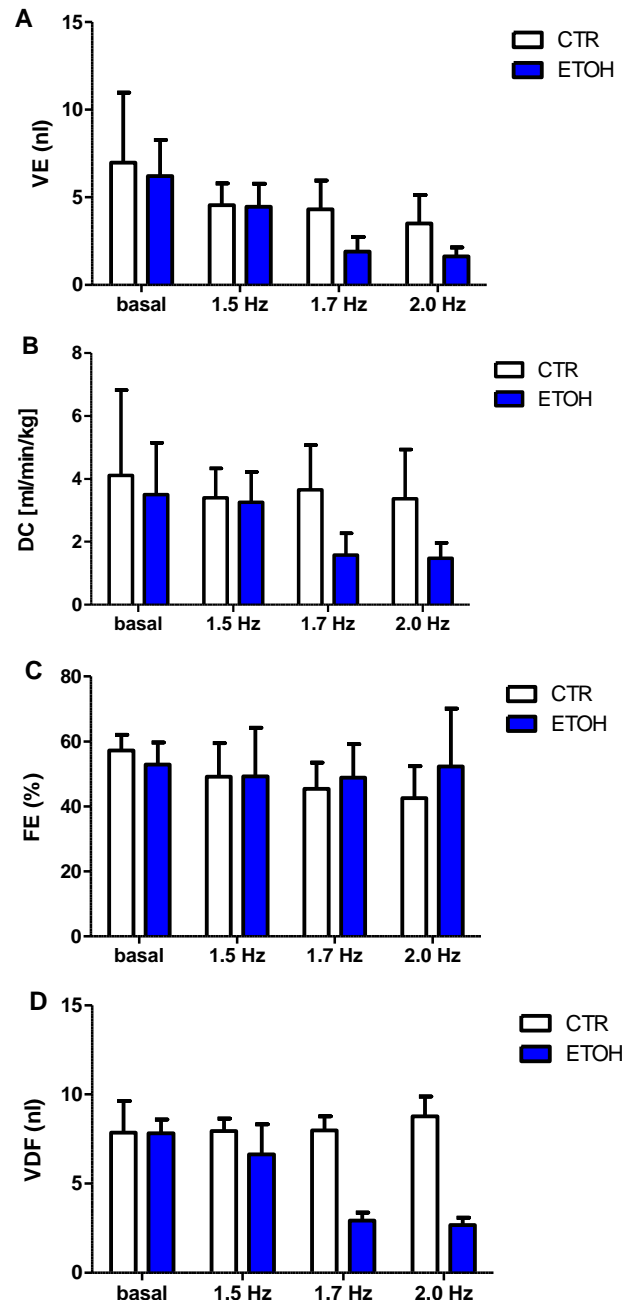


Figura 3 - Efeitos da inalação de etanol (EtOH) e da frequência estimulatória sobre os parâmetros volume ejetado (VE), débito cardíaco (DC), fração de ejeção (FE) e (volume diastólico final (VDF) no coração do inseto *T. molitor*. Barras e traços verticais representam médias e desvios-padrões, respectivamente.

DC (figura 3B) foi significativamente afetado pelo tratamento ($p < 0,05$), mantendo-se estável no grupo CTR, como já descrito em trabalho anterior (INAZUMI et al., 2022), aparentemente devido à compensação da queda de VE pelo aumento de frequência. Contudo, no grupo EtOH, a elevação de frequência não parece ter sido suficiente para manter DC, que se mostrou reduzido nas frequências mais altas.

FE (Figura 3C) não se alterou significativamente com a frequência ou tratamento embora uma tendência de queda apenas em CTR necessite ser confirmada por experimentos adicionais.

VDF (Figura 3D) foi estimado para investigar possíveis mecanismos para a queda acentuada de VE no grupo EtOH. Observou-se interação significativa entre tratamento e frequência ($p < 0,05$), expressa pela grande queda do parâmetro nas frequências mais elevadas, o que indica menor enchimento diastólico do coração, o que é esperado causar queda de VE sem alteração de FE.

CONCLUSÕES:

A exposição aguda (1 h) ao vapor de EtOH causa neste modelo alterações funcionais cardiovasculares, caracterizadas por considerável redução do enchimento diastólico do coração e, conseqüentemente, do volume ejetado a cada contração e do DC.

BIBLIOGRAFIA

ADAMSKI, Z., BUFO, S. A., CHOWAŃSKI, S., FALABELLA, P., LUBAWY, J., MARCINIAK, P., PACHOLSKA-BOGALSKA, J., SALVIA, R., SCRANO, L., SŁOCIŃSKA, M., SPOCHACZ, M., SZYMCZAK, M., URBAŃSKI, A., WALKOWIAK-NOWICKA, K., & ROSIŃSKI, G. (2019). **Beetles as model organisms in physiological, biomedical and environmental studies - A review.** *Frontiers in Physiology*, 10, 319. doi: 10.3389/FPHYS.2019.00319/BIBTE

BHATTACHARYA, A. K., AMEEL, J. J., & WALDBAUER, G. P. (1970). **A Method for Sexing Living Pupal and Adult Yellow Mealworms.**

Annals of the Entomological Society of America, 63(6), 1783–1783. doi: 10.1093/AESA/63.6.1783

FELICIANO, D. F., BASSANI, R. A., OLIVEIRA, P. X., & BASSANI, J. W. M. (2011). **Pacemaker activity in the insect (*T. molitor*) heart: Role of the sarcoplasmic reticulum.** *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 301(6), 1838–1845. doi: 10.1152/ajpregu.00089.2011

FIM NETO, A., BASSANI, R. A., DE OLIVEIRA, P. X., & BASSANI, J. W. M. (2018). **Sources of Ca^{2+} for contraction of the heart tube of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).** *Journal of Comparative Physiology B* 2018 188:6, 188(6), 929–937. doi: 10.1007/S00360-018-1183-0

INAZUMI, F.H.K., Calderon N.C.B., Santana, A.R., Bassani R.A., Bassani, J.W.M. **Estimation of cardiac output in insect hearts paced at different rates.** Paper presented at: IX Congresso Latino-Americano de Engenharia Biomédica (CLAIB 2022) e o XXVIII Congresso Brasileiro de Engenharia de Engenharia Biomédica (CBEB 2022); 2022 Oct 24-28; Florianópolis, Brasil.

KAMRAN, K., KHAN, M. Y., & MINHAS, L. A. (2013). **Ethanol vapour induced dilated cardiomyopathy in chick embryos.** *Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(9), 1084–1088.

LE FOLL, B., & LOHESWARAN, G. (2014). **Alcohol inhalation.** *Canadian Medical Association Journal*, 186(10), E399–E399. doi: 10.1503/CMAJ.131763

MACLEAN, R. R., VALENTINE, G. W., JATLOW, P. I., & SOFUOGLU, M. (2017). **Inhalation of Alcohol Vapor: Measurement and Implications.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(2), 238–250. doi: 10.1111/ACER.13291

MACLEAN, R. R., VALENTINE, G. W., JATLOW, P. I., & SOFUOGLU, M. (2017). **Inhalation of Alcohol Vapor: Measurement and Implications.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(2), 238–250. doi: 10.1111/ACER.13291

RISTUCCIA, R. C., & SPEAR, L. P. (2005). **Sensitivity and Tolerance to Autonomic Effects of Ethanol in Adolescent and Adult Rats During Repeated Vapor Inhalation Sessions.** *Alcoholism:*

Clinical and Experimental Research, 29(10), 1809–1820. doi: 10.1097/01.ALC.0000183010.72764.CD

STEWART, J. (2013). **Cálculo** (7th ed., Vol. 1). 664 pp. Cengage Learning.

WOLF, M. J., AMREIN, H., IZATT, J. A., CHOMA, M. A., REEDY, M. C., & ROCKMAN, H. A. (2006). **Drosophila as a model for the identification of genes causing adult human heart disease**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(5), 1394–1399. doi: 10.1073/PNAS.0507359103