UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR ETANOL SOBRE A MORFOLOGIA DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS MACHOS ADULTOS WISTAR

LÚBIA CRISTINA FONSECA

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia, MG
Fevereiro de 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR ETANOL SOBRE A MORFOLOGIA DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS MACHOS ADULTOS WISTAR

LÚBIA CRISTINA FONSECA

Graduanda

NILSON PENHA SILVA

Orientador

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia, MG

Fevereiro de 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR ETANOL SOBRE A MORFOLOGIA DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS MACHOS ADULTOS WISTAR

LÚBIA CRISTINA FONSECA

Parecer da comissão examinadora:

- [x] Aprovado
- [ ] Reprovado

Professor Dr. Nilson Penha Silva

Professor Tales Alexandre Aversi Ferreira

Professor Dr. Miguel Antonio Facury Neto

Uberlândia, 20 de fevereiro de 2003

"Comece fazendo
o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente
você estará fazendo
o impossível."
(São Francisco de Assis)

Ofereço à minha família,
pelo carinho e compreensão.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus. Em muitos momentos, sozinha, eu lamentava pelos experimentos que não davam certo e pelas dificuldades que apareciam ao longo do caminho. Como eu não queria e nem devia desistir de meus objetivos, eu apenas pedia a Ele forças para continuar minha caminhada. E, assim, inúmeras vezes, eu sentia uma energia infinitamente maior, que me acalentava e renovava minha esperança de que no outro dia tudo iria ser diferente e iria dar certo. Nesses momentos, eu percebia que não estava sozinha, que Ele estava e está sempre por perto.

Agradeço aos meus pais, Dorinato Gonçalves da Fonseca e Delia Maria Gonçalves da Fonseca, por terem me concedido a vida, e mais do que isso, por sempre serem os primeiros a me incentivar a lutar por meus sonhos, e principalmente por terem me ensinado o verdadeiro significado da vida. A eles devo a certeza de minha capacidade, a aceitação de minhas limitações, e a compreensão de que é necessário manter a humildade para aprender e respeito para conviver em harmonia. Estes ensinamentos contêm a essência da felicidade, que não exclui a existência de momentos difíceis ou situações insuperáveis, fatos inevitáveis da vida.

Aos meus irmãos, Alan Carlos Fonseca Dorinato Fábio Gonçalves Júnio, eu agradeço pelo amor e respeito que sempre nos uniram e que, sem dúvida, são grandes motivos para que eu continue lutando e possa ser um exemplo a ser seguido por eles.

Eu agradeço aos meus tios, primos e, principalmente, aos meus avós, Pedro José Gonçalves e Maria Luíza Gonçalves, pois eles são o marco do meu esforço; por eles cumpro minhas atividades em contagem regressiva na expectativa de reencontrá-los.

Ao amigo Tales Alexandre Aversi Ferreira, que mesmo sem me conhecer e saber das minhas habilidades e dificuldades, me estendeu a mão e me guiou até um lugar seguro e confiável, pois no fundo pressentia que não poderia estar fisicamente ao meu lado. Mais do que isso, ele me mostrou o quanto é importante ser perseverante em nossos sonhos.

Ao Professor Dr. Nilson Penha Silva, por me acolher com tanto carinho, mesmo desconhecendo a minha pessoa e por sua constante participação em meu crescimento, que não se limita ao mero conhecimento científico, que qualquer mestre poderia transmitir. Somente um mestre especial, como ele, é capaz de ensinar através de sua simplicidade o significado de ser uma pessoa sábia.

Às amigas do laboratório – Yara Almeida Viana, Nádia Rúbia Ferreira e Norita Gonçalves Magalhães- pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

Aos técnicos, funcionários e professores do Laboratório de Histologia e do Laboratório de Patologia, em especial ao Professor Dr. Marcelo Emílio Beletti e ao José Alencar de Oliveira, pelo auxílio e atenção dedicados a mim.

Aos meus amigos Daniela Valéria Fonseca, Cristiane Ribeiro Alves, Lorraine Lemes, Fausto Capparelli, Teresa Cristina Leandro de Jesus, Narcisa Soares, Luciana Oliveira, Vanessa Salomão, Cláudio José de Carvalho, Ana Paula de Oliveira, Meyr Cruz, Janainy Martins de Carvalho, Shirleny Romualdo Cardoso, Daniela Naves, Marissa Fernandes e todos os demais colegas da 49ª. turma do curso de Ciências Biológicas da UFU.

À Juliana Franco, e à Adriana Franco, pela amizade verdadeira e cumplicidade em todos os momentos.

Aos amigos de Patos de Minas, Carlos Eduardo Fernandes, Juliana Queiroz Nunes, Marina Xavier, Ediene Caixeta, Marília Alves de Castro, Karla Caixeta, Fernanda Dias e Renata Santos, que embora distantes sempre acreditaram em meu sucesso.

À amiga e professora de inglês, Luciana Neilla, pela ajuda na compreensão dos artigos científicos.

Aos amigos da Universidade Estadual de Goiás, pela participação nos experimentos.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, eu deixo aqui o meu muito obrigado.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 01

MATERIAL E MÉTODOS 06

Preparo da Solução Golgi-Cox 06

Alcoolização e Sacrifício dos Animais 07

Parafinização e Montagem das Lâminas 08

Análise e Captura de Imagens 09

RESULTADOS E DISCUSSÃO 10

Alcoolização e Sacrifício dos Animais 10

Fixação com Solução Golgi-Cox 10

Parafinização e Montagem das Lâminas 11

Análise e Captura de Imagens 12

CONCLUSÃO 13

FIGURA 1 14

FIGURA 2 15

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 16

RESUMO

Este trabalho analisa a exposição por um dia ao etanol sobre o córtex cerebral de ratos. Foram utilizados 10 ratos machos adultos, 4 para o grupo controle e 6 para o grupo problema. Cada rato problema foi submetido a três injeções intraperitoneais de etanol a 30%, a cada 8 horas. A dose de etanol foi 3g / Kg, totalizando 9 g / Kg. O grupo controle recebeu apenas soro fisiológico. Os ratos foram, então, anestesiados, sacrificados e tiveram seus cérebros retirados, devidamente fragmentados, envoltos em gazes e imersos em solução de Golgi-Cox. Após fixação, os fragmentos foram desidratados, parafinizados e seccionados. Apenas 8 lâminas foram viáveis, 3 provenientes de 1 animal controle e 5 provenientes de 2 animais problemas. Os animais submetidos ao soro fisiológico apresentaram 42,7 +- 7,6, enquanto os animais submetidos ao etanol apresentaram 46,0 +-13,7 neurônios por campo. A diferença observada é pequena em relação à magnitude da variabilidade encontrada, de tal maneira que não é possível concluir que o tratamento agudo com etanol por 24 horas tenha alterado a densidade neuronial do córtex de ratos.

Palavras-chaves: álcool; densidade neuronial; nerurotoxicidade

INTRODUÇÃO

O córtex é a principal estrutura do sistema neural no que se refere às funções sensoriais, motoras e associativas. Os modos como as células se organizam e como suas conexões são formadas dependem diretamente de seu desenvolvimento embrionário, bem como de processos de migração celular (**Super, Soriano & Uylings, 1998**).

Desde o começo do século passado, numerosas questões sobre a origem, evolução e função do córtex têm sido respondidas, mas muitas questões ainda estão sem respostas (**Broccoli, 1999**).

As seis camadas do neocórtex ou isocórtex de mamíferos constituem uma recente aquisição evolutiva não encontrada em aves e répteis, o que justifica seu enorme tamanho (800 cm^2 por hemisfério) e complexidade (10^{11} neurônios) em humanos (**Broccoli, 1999**).

O neocórtex de mamíferos lisencéfalos é particularmente bem conveniente para estudos correlativos da estrutura básica das funções sensoriais e motoras, pois é composto das principais classes de neurônios arranjados nas 6 camadas com as características típicas dos mamíferos girencéfalos (**Caviness, 1975**).

As camadas corticais são formadas principalmente por 4 tipos de neurônios, designados como piramidais, granulares, fusiformes e horizontais.

As células piramidais, que correspondem a 2/3 dos neurônios corticais, são as células mais características. Elas possuem o soma de forma triangular em corte longitudinal, com o ápice apontando para a superfície do córtex e com um proeminente dendrito emergindo deste ápice; o axônio origina-se na base do triângulo ou de algum dendrito basilar, com uma altura entre 10 e 50 μ em humanos. Somente os neurônios piramidais retêm e expandem suas conexões originais desde a camada III ou V até a camada I (**Marin-Padilla, 1992**).

As células granulares são relativamente pequenas, medindo entre 4 e 10 μ de diâmetro no humano, com uma forma estrelada devida à irradiação tridimensional dos dendritos.

As células fusiformes são pequenas, possuem uma forma alongada, semelhante a um charuto, e aparecem em ângulo reto em relação à superfície do córtex. Elas são células piramidais modificadas. As células horizontais ou de Cajal são pequenas e estão limitadas à camada I.

Todos os quatro tipos de neurônios citados, quando diferenciados, formam as camadas corticais do neocórtex, chamado de córtex homotípico. Mas, em indivíduos diferentes, ocorrem variações acentuadas na composição das células e espessura das diferentes camadas.

Estas variações são responsáveis pela composição do córtex cerebral do adulto em 6 camadas horizontais, chamadas de camadas de Brodman (**Marin Padilla, 1992**). O córtex é também estratificado em colunas, cerca de 40; elas são fisiologicamente responsáveis pelo comando motor de várias regiões do corpo e pela compreensão de informações aferentes provenientes de várias partes do corpo.

O neocórtex do rato normal apresenta as mesmas características do neocórtex dos mamíferos lisencéfalos. Ele é também constituído pelas 6 camadas convencionais de Brodman, e também contém as mesmas classes de conexões intercelulares do neocórtex humano (**Caviness, 1975**).

A camada I (molecular) possui as células horizontais ou de Cajal muito escassas, sendo rica em fibras horizontais, chamadas de extrato tangencial (**Caviness, 1975**).

A camada II (granular externa) apresenta abundância de neurônios granulares densamente dispostos e algumas células piramidais muito pequenas. Essa camada é demarcada por uma condensação superficial de pequenas células piriformes (**Caviness, 1975**).

A camada III (piramidal externa) possui as células piramidais organizadas de forma que as células menores estão próximas à camada granular externa e as células maiores estão situadas mais profundamente na camada. No tipo de córtex polar essa camada é fina e os neurônios piramidais são de pequeno porte. Há nessa camada um proeminente extrato de fibras tangenciais (**Caviness, 1975**).

A camada IV (granular interna) é considerada a estação receptora do córtex, com muita mielina e abundância de neurônios granulares, mas com poucos neurônios piramidais, muito pequenos, reconhecidos por serem maiores que os neurônios granulares e por sua forma típica.

A camada V (piramidal interna) possui células piramidais de pequeno a médio porte com neurônios granulares espalhados e em pequena quantidade. Ela possui as maiores células piramidais e é a camada mais uniforme em termos celulares (**Caviness, 1975**).

A camada VI (multiforme ou fusiforme) possui células globulares em sua porção mais externa e células fusiformes, com aspecto alongado em relação ao eixo crânio-caudal, em sua porção mais interna (**Caviness, 1975**).

As variações nas diferentes camadas permitiram a identificação de vários tipos de córtex, compreendendo o córtex agranular, o granular piramidal, o granular parietal, o polar e o granular (**Burt, 1995**).

O córtex agranular piramidal ou simplesmente agranular tem uma predominância de neurônios piramidais em praticamente todas as camadas, com escassez de neurônios granulares, o que resulta em camadas de neurônios piramidais externa e interna muito espessas.

O córtex granular-piramidal (tipo frontal) tem seis camadas bem diferenciadas, com muitos neurônios de grande porte nas camadas piramidais e uma camada granular interna muito proeminente. Esse tipo de córtex está exemplificado principalmente na área 4 de Brodman, chamada de área motora primária.

O córtex granular parietal também possui seis camadas distintas, mas as células piramidais são de pequeno a médio tamanho e estão localizadas no lobo parietal inferior e no giro temporal superior.

O córtex polar tem seis camadas, mas é bem fino e rico em neurônios granulares e pobre em neurônios piramidais. É exemplificado pelo pólo pré-frontal e pólo occipital.

O córtex granular possui principalmente os neurônios granulares com exclusão quase completa dos neurônios piramidais.

O lobo pré-frontal do rato adulto é formado por um córtex homotípico polar e possui as seis camadas anteriormente descritas (**Caviness, 1975**).

A estratificação horizontal do córtex é de importância considerável para que as funções normais do cérebro sejam executadas.

As proliferações celulares são geralmente ligadas ao desenvolvimento de um processo que é finalizado no período pré-natal.

Poucas exceções para essa regra são conhecidas em certas regiões do cérebro de mamíferos denominadas de córtex cerebelar pós-natal e camada subependimal adulta (**Gobetto et al, 1995**).

O sistema neural em desenvolvimento produz muito mais neurônios do que os que sobrevivem no adulto e somente aqueles que fizerem o maior número possível de conexões sobreviverão para formar o córtex.

Esses eventos são regulados de modo coordenado para formar uma densidade neuronial que é aproximadamente a mesma de região para região do mesmo cérebro e nos cérebros de diversas espécies de mamíferos (**Caviness, 1975; Takahashi, Nowakowski & Caviness, 1996**).

Muitos estudos mostram que anormalidades genéticas ou fatores epigenéticos que induzem distúrbios em células gliais ou interação neurônio-célula glial podem conduzir a anormalidades moleculares, morfológicas e funcionais do cérebro.

O etanol causa importantes efeitos neurotóxicos no cérebro. Ele afeta as estruturas do citoesqueleto dos neurônios (**Miller, 1993**), provoca alterações dos sistemas sinalizadores neuroniais, incluindo o Ca^{2+} (**Vizi, Palf & Gulya, 2000**).

Além disto, ele pode causar problemas morfológicos, que interferirão em muitas funções, como a atividade integrada do córtex (aferente, eferente e associativo) (**Aversi Ferreira, 2001**).

O etanol exerce efeitos locais nas membranas das células do córtex. Ele reduz a excitabilidade dos neurônios das camadas 2, 3 e 5, provoca aumento da reobase, diminuição da resistência interior, reduz a amplitude dos potenciais pós-sinápticos e a probabilidade de despertar potenciais de ação. A supressão dos potenciais pós-sinápticos mediados pelo etanol é mais intensa nos neurônios da camada 5. Desse modo, o etanol interrompe processos de informação somato-sensorial via alteração diferencial de propriedades de membrana e transmissão sináptica dos neurônios corticais (**Sessler et al., 1998**).

Estudos recentes mostram a ocorrência de efeitos nocivos do etanol na fluidez das membranas, com perturbação na função de proteínas de membranas, por ruptura na interação com lipídeos associados (**Diamond & Gordon, 1997**). As proteínas são o alvo primário do etanol (**Vizi, Palfi & Gulya, 2000**). O etanol pode causar profundas mudanças na excitabilidade neuronial e na transdução de sinais, levando a disfunções do sistema mensageiro secundário, inclusive nos níveis do íon Ca^{++} (**Chandler, Harris & Crews, 1998; Diamond & Gordon, 1997; Hamoudi, Iqbal & Sze, 1995**).

Além disso, o etanol em uma concentração de 150 mg/dL, muito abaixo do nível letal, que é de 400 mg/dL, é uma das mais potentes drogas inibidoras da produção do fluido

cerebroespinhal. Entretanto, este efeito, que tem uma rápida velocidade de instalação, também é totalmente revertido após 15 minutos de abstenção do etanol (**Javaheri & Corbett, 1998**).

O etanol induz vários distúrbios no desenvolvimento do cérebro normal, incluindo depressão da neurogênese, morte celular, retardo e aberração na migração neuronial, além de alterar a formação de projeções dendríticas e axônicas.

Em um estudo feito com ratos como modelo experimental, foi verificada que a ingestão de etanol foi acompanhada por um padrão de mudanças no metabolismo cerebral, com aumentos significativos de utilização de glicose pelo pólo rostral, concha do núcleo acumbens, córtex medial pré-frontal, núcleo central e basolateral de amigdala, área tegmental ventral e substância negra compacta (**Porrino, Whitlow & Samson, 1997**).

O rato tem sido usado sucessivamente em estudos de defeitos induzidos pelo etanol na estrutura cortical (**Miller, 1993**). Além disto, a estrutura citoarquitetônica de seu sistema neural também contém as seis camadas de Brodman, bem como as mesmas classes de conexões intercelulares dos humanos (**Caviness, 1975**). O estudo dos efeitos nocivos da intoxicação aguda do etanol em ratos com certeza traz importantes revelações sobre a intoxicação de humanos pelo etanol.

É dentro deste contexto que este trabalho foi proposto, com o objetivo de analisar os efeitos da exposição ao etanol, por um dia, sobre a morfologia do córtex de ratos adultos em relação a um grupo controle não alcoolizado, no intuito de detectar possíveis alterações na densidade neuronial.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Todos os reagentes utilizados neste projeto (dicromato de potássio, cromato de potássio, cloreto de mercúrio, cloreto de sódio, álcool absoluto, acetona, xileno e éter etílico) eram de alto grau de pureza (PA ou ACS). As anestesias foram produzidas com uma mistura 1:1 de Quetamina a 5% e Xilazina a 2%. As soluções salinas fisiológicas foram preparadas com NaCl a 0,9 % em água desionizada esterilizada. Todas as vidrarias (funis e frascos de vidro), bem como os instrumentos cirúrgicos utilizados (tesoura e bisturi cirúrgicos) foram previamente esterilizados por aquecimento em estufa de esterilização. As seringas utilizadas eram seringas esterilizadas descartáveis. Os cortes histológicos foram feitos em blocos de parafina histológica, utilizando um micrótomo **American Optical 820**. As pesagens foram feitas com uma balança analítica **AND** modelo **HR-120**. As incubações sob temperaturas constantes foram feitas em banho-maria termostatizado **Marconi** modelo **MA184**. As análises histológicas foram feitas em um microscópio óptico da marca **Olimpus**, **modelo Px40**, acoplado a uma câmera digital marca **Oly 200**, interligada a um microcomputador **PC celerom 300** através de uma placa digitalizadora **data translation** 3153 (DT 3153).

Preparo da solução de Golgi-Cox

Foram preparados 700 mL da solução de Golgi-Cox no laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela mistura de soluções a 5% p/v de dicromato de potássio, cloreto de mercúrio e cromato de potássio. 12,5 g de dicromato de potássio foram dissolvidos, sob aquecimento a 50 °C e agitação constante,

em água destilada até completar o volume final de 250 mL de solução. Da mesma forma, 12,5 g de cloreto de mercúrio foram dissolvidos em água destilada, sob aquecimento a 60 °C e agitação constante, até completar o volume final de 250 mL. 10 g de cromato de potássio foram dissolvidos, à temperatura ambiente e sob agitação, até completar o volume final de 200 mL. As três soluções foram misturadas lentamente e a mistura foi filtrada em papel filtro e estocada em frasco de vidro âmbar.

Alcoolização e sacrifício dos animais

Esta etapa do trabalho também foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Neste experimento foram utilizados 10 ratos machos adultos, com peso variando entre 211 e 308 g, cedidos pelo Biotério do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Uberlândia. Foram escolhidos aleatoriamente 4 animais para comporem o grupo controle e outros 6 animais para constituírem o grupo problema.

Cada rato do grupo problema foi submetido a três injeções intraperitoneais de uma solução de etanol a 30%, aplicada a cada 8 horas, num intervalo total de tempo de 24 horas. A dose de etanol em cada aplicação foi de 3 g por kg de peso corporal do rato, de tal maneira que cada animal recebeu um total de 9 g de etanol por kg de peso corporal ao final das 24 horas de tratamento. Os ratos do grupo controle receberam tratamentos idênticos, porém com aplicações de soro fisiológico.

Tanto os animais do grupo controle quanto do grupo problema foram anestesiados com 0,1 mL por 100g de peso corporal de uma mistura 1:1 de quetamina a 5% e xilazina a 2%, no intuito de minimizar o sofrimento dos animais experimentais.

Ao fim da exposição ao etanol ou ao soro fisiológico, os ratos foram anestesiados, sacrificados e seus cérebros foram retirados, separados em hemisférios direito e esquerdo e em lobos frontal e occipital. Os fragmentos foram envoltos individualmente em gazes cirúrgicas e imersos em solução fixadora para neurônios, a solução de Golgi-Cox (**Marin-Padilla, 1987**). Os frascos foram identificados com a legenda **Rx-Hy-Lz-A** ou **Rx-Hy-Lz-C**, nas quais **x** identificava o número do rato em algarismos arábicos de **1** a **10**; **y** identificava o hemisfério cerebral, sendo **D** para o hemisfério direito e **E** para o esquerdo; e a letra **z** indicava o lobo cerebral, sendo **F** para o lobo frontal e **O** para o occipital. As letras **A** e **C** identificava os animais alcoolizados e controles, respectivamente.

O processo de coloração foi monitorado com a execução de cortes manuais, uma vez por semana, durante 90 dias, pela pesquisa da marcação de espículas dendríticas. A presença

de grumos intensos de marcação nas espículas terciárias sinalizavam o final do processo de coloração (**Marin-Padilla, 1987**).

Parafinização e montagem das lâminas

Essa etapa foi realizada de acordo com dois protocolos diferentes.

O primeiro protocolo (**protocolo 1**) foi realizado no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia. Foram selecionados aleatoriamente quatro hemisférios (R7-HE-LF-C, R4-HE-LF-C, R3-HE-LF-A, R5-HE-LF-A), sendo os dois primeiros do grupo controle e dois últimos do grupo problema. Esse material foi submetido aos seguintes tratamentos: 1) etanol-acetona a 1:1, por 3 horas; 2) etanol a 100%, por 30 minutos; 3) etanol-éter a 1:1, por 30 minutos; 4) xilol (I), por 40 minutos; 5) xilol (II), por 40 minutos; 6) xilol-parafina, em estufa a 56 °C, por 20 minutos; 7) parafina (I), em estufa a 56 °C, por 20 minutos; 8) parafina (II), em estufa a 56 °C, por 20 minutos; 9) parafina (III), em estufa a 56 °C, por 20 minutos. Os tratamentos de 1 a 5 constituem uma etapa de desidratação do material, enquanto os tratamentos de 6 a 9 constituem a etapa de parafinização do material. Após o banho III em parafina, cada material foi colocado de forma individual, previamente identificado segundo a legenda já descrita, com o corte sagital apoiado pela parte inferior, seguida da adição de parafina nova. Esse material foi incubado à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, esse material foi seccionado em micrótomo manual, em fatias de 50, 41, 36, 31, 26 e 21 micrômetros, as quais foram colocadas em banho-maria a 37 °C e pescadas em lâminas histológicas. As lâminas ficaram em estufa a 56 °C por 24 horas. Após imersão em xilol por 15 minutos, as lâminas foram montadas com etelan e lamínulas.

Alternativamente, a preparação das lâminas foi feita de acordo com outro tipo de protocolo (**protocolo 2**), no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia. Inicialmente, o material era desidratado por imersão em álcool absoluto durante 72 horas, com 2 trocas do álcool ao dia, e por 2 imersões em banho de xilol durante 30 minutos cada imersão. A parafinização era executada por imersão em 2 banhos de parafina durante 40 minutos cada imersão, em estufa a 70 °C, seguida por imersão em parafina nova por 2 horas à temperatura ambiente. Os blocos eram então retirados das formas e levados ao congelador. Os blocos foram seccionados em fatias com 12 micrômetros de espessura, colocados em banho-maria a 37 °C, e pescados em lâminas histológicas. As lâminas foram incubadas na estufa a 70 °C, por aproximadamente 2 horas, quando foram imersas em xilol, durante 15 minutos,

mergulhadas em um banho rápido com álcool absoluto e montadas com etelan e lamínulas.

Análise e captura de imagens

As lâminas foram analisadas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob a orientação do Professor Dr. Marcelo Emílio Beletti. Foi utilizado um microscópio da marca Olimpus Px40, acoplado a uma câmera digital Oly 200, interligada a um microcomputador PC celerom 300 através de uma placa digitalizadora Data translation 3153 (DT 3153). A captura de imagens foi feita usando uma objetiva de 4X e uma ocular de 2,5X. A área delimitada para a contagem de células foi 2 mm^2, tendo sido a contagem executada manualmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alcoolização e sacrifício dos animais

Todos os animais, tanto do grupo controle quanto do grupo problema, receberam todas as respectivas doses de soro fisiológico e etanol, por injeção intraperitoneal sem perda visível de solução injetada durante a administração.

Quanto ao comportamento, os animais tratados com soro fisiológico não se prostaram; porém os animais tratados com etanol apresentavam-se mais abatidos e sem coordenação de movimentos à medida em que se prosseguia as injeções. Oito horas depois da última injeção de etanol, os animais mostraram-se homogeneamente prostrados.

Depois de 24 horas desde o início dos respectivos tratamentos com álcool e soro fisiológico, todos os animais foram anestesiados, conforme descrito no protocolo, e em seguida foram sacrificados. Durante o sacrifício, não houve perda de nenhuma parte do material, mesmo que algum tipo de perda pudesse ocorrer em decorrência da fragilidade do material e a visível dificuldade em se remover a calota craniana dos animais para a remoção total de seus cérebros.

Fixação com a solução de Golgi-Cox

A solução fixadora de Golgi-Cox marcou os neurônios como se era esperado (**Marin-Padilla, 1987**). Após uma monitoração semanal de aproximadamente 15 semanas, o material apresentava grumos intensos de marcação nas espículas dendríticas terciárias, estando pronto para a continuação do experimento.

Parafinização e montagem das lâminas

Os hemisférios (R7-HE-LF-C, R4-HE-LF-C, R3-HE-LF-A, R5-HE-LF-A) preparados conforme o **protocolo 1**, apresentaram-se totalmente quebradiços ao serem seccionados. Essa fragmentação ocorreu em todos as espessuras de cortes utilizadas, ou seja, 50, 41, 36, 31, 26 e 21 μm. Apesar da fragmentação do material e da dificuldade em se abrir os cortes na água, foram feitas todas as lâminas possíveis dos cortes que se abriram, resultando num total de 20 lâminas. Porém, era visível que essas lâminas não apresentariam resultados satisfatórios durante a análise microscópica.

Esse resultado provavelmente decorreu de algum problema durante os passos de desidratação; o material pode não ter perdido totalmente a água de seu interior, o que teria impedido a parafina de penetrar no tecido, uma vez que a parafina tem constituintes de natureza hidrofóbica. Outro possível motivo para o problema apresentado poderia ser uma alteração não detectada da temperatura da estufa histológica; um aumento de temperatura acima de 57 °C é suficiente para danificar a parafina histológica segundo as instruções do próprio fabricante.

Uma única amostra (R-7-HE-LF-C), processada segundo o protocolo 2, apresentou melhores resultados em comparação com as amostras processadas de acordo com o protocolo 1. Esse material não apresentava-se quebradiço como os anteriores, porém ainda houve dificuldade em se abrir os cortes com espessuras de 50, 41, 35, 25, 21 e 12 μm. Dentre essas espessuras, a única que permitiu um corte completo do material foi a de 12 μm. Pode ser que esse material, processado segundo o protocolo 2, tenha sido melhor desidratado, motivo pelo qual não se tenha fragmentado como os outros do protocolo 1. Por outro lado, a permanência da dificuldade em se abrir os cortes pode ter decorrido da espessura, uma vez que os cortes feitos a uma espessura de 12 μm abriram-se, tendo sido possível a preparação de uma lâmina aparentemente boa para posterior análise microscópica.

O restante do material, que compreendia 15 hemisférios, cujo processamento seguiu as normas do protocolo 2, usando cortes com espessura de 12 μm, resultou em 12 lâminas procedentes de cérebros de animais tratados com soro fisiológico e 28 lâminas procedentes de cérebros de animais alcoolizados, totalizando 40 lâminas. Apesar do número de lâminas estar próximo de 3 lâminas para cada amostra, como seria desejável, houve muita perda de material decorrente da dificuldade de se abrir os cortes na água. Embora, os cortes não tenham ficado quebradiços nem muito espessos como aqueles resultantes do protocolo 1, uma possível causa para a diferença entre esses cortes e aquele único corte usado como controle do protocolo 2

pode ter sido a temperatura da estufa histológica. No protocolo 2, a temperatura utilizada foi de 70 °C, embora a temperatura ideal recomendada pelo fabricante da parafina usada é de 56 °C.

Análise e captura de imagens

Das 20 lâminas preparadas segundo o protocolo 1, juntamente com as 41 lâminas preparadas de acordo com o protocolo 2, analisadas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, somente 8 lâminas apresentaram cortes que permitiram a contagem de células.

A análise das 20 lâminas preparadas pelo protocolo 1, mostrou a presença de neurônios, porém como já se havia previsto, os cortes estavam fragmentados e com certeza não revelavam com precisão números confiáveis de células por campo delimitado. Por esse motivo todas essas lâminas foram descartadas.

Das 41 lâminas preparadas segundo o protocolo 2, apenas 8 apresentaram células, sendo que dessas 8 lâminas, 3 eram referentes a apenas 1 animal do grupo controle, e 5 eram referentes a 2 animais do grupo problema. As outras 33 lâminas continham apenas substância branca.

É possível que esse resultado tenha ocorrido justamente pelo fato dos blocos contendo o tecido cerebral terem sido seccionados além do córtex cerebral, em várias tentativas sem sucesso, uma vez que os cortes não se abriam, atingindo a substância branca, que no tecido cerebral localiza-se internamente em relação ao córtex.

Após a contagem das células, foi verificado que as 3 lâminas resultantes do animal controle (**Figura 1**) apresentaram 48, 46, e 34 neurônios por campo delimitado, enquanto as 5 lâminas referentes aos dois animais tratados (**Figura 2**) apresentaram 38, 42, e 34 em um animal e 47 e 69 no outro. Assim, os animais submetidos ao tratamento agudo com soro fisiológico por 24 horas apresentaram 42,7 ± 7,6 neurônios por campo, enquanto os animais submetidos ao tratamento agudo com etanol por 24 horas apresentaram 46,0 ± 13,7 neurônios por campo delimitado. A diferença observada é pequena em relação à magnitude da variabilidade encontrada, de tal maneira que não é possível concluir que o tratamento agudo com etanol por 24 horas tenha alterado a densidade neuronial do córtex de ratos de acordo com os métodos executados até o presente momento.

CONCLUSÃO

Aparentemente, o tratamento agudo com etanol por 24 horas não afetou de maneira estatisticamente significante a densidade neuronial do córtex dos animais analisados. Esta conclusão é questionável, e precisa ser alvo de outra avaliação, uma vez que as amostras viáveis de tecidos analisadas foram pouco expressivas.

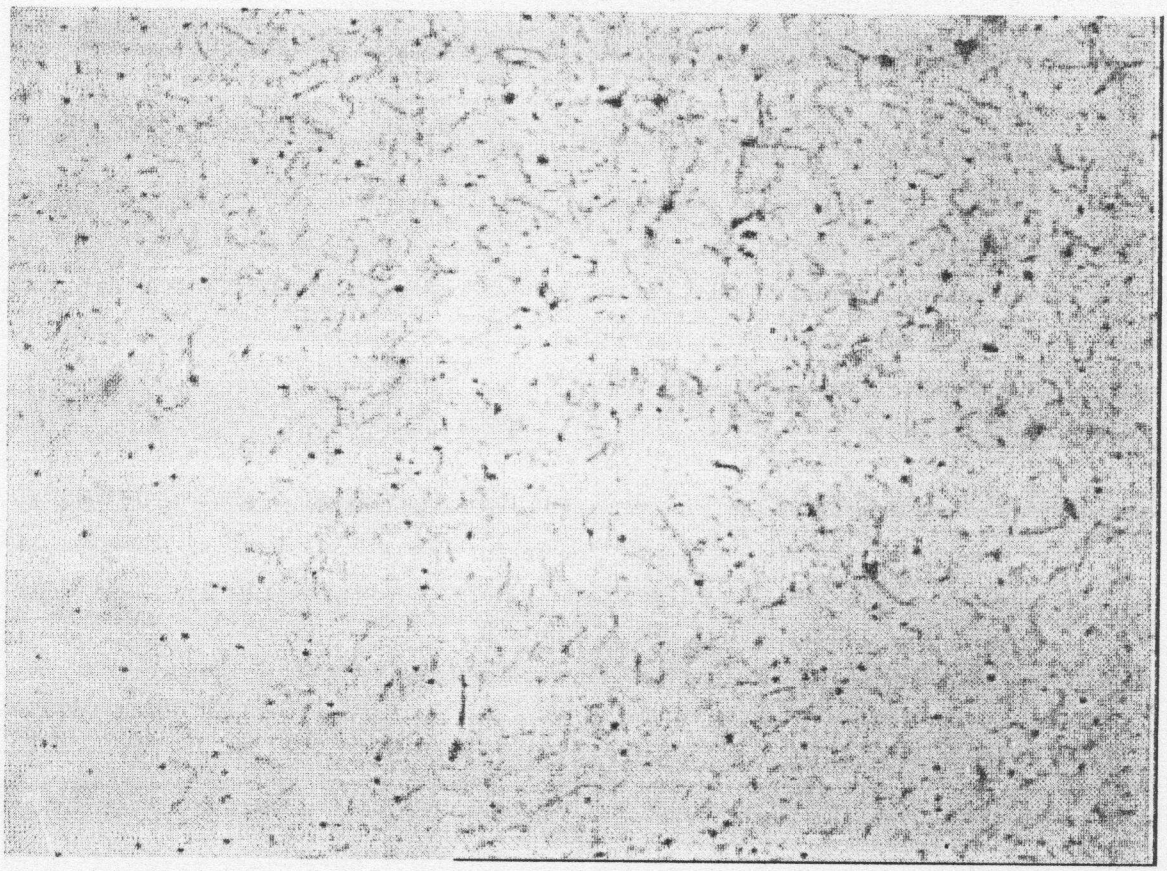


Figura 1 – Amostra de um corte histológico do córtex frontal de um rato do grupo controle.



Figura 2 – Amostra de um corte histológico do córtex frontal de um rato do grupo problema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERSI FERREIRA, T. A. Efeitos do etanol sobre a migração neuronial para o córtex pré-frontal: um estudo imunohistoquímico empregando bromodeoxiuridina. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biologia, área de concentração em Morfologia. P. 1-70, Goiânia, 2001.

BROCCOLI, V. Evolutionary development of the cerebral cortex. **Bioessays**, v. 21, p. 947-977, 1999.

BURT, A. M. Neuroanatomia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1995, p. 27-35.

CAVINESS JR, V.S. Architetonic map of neocortex of the normal mouse. **J. Comp. Neurol.**, v. 164, n. 2, p. 247-263, 1975.

CHANDLER, L.J.; HARRIS, R.A.; CREWS, F.T. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 19, p. 491-495, 1998.

DIAMOND, I.; GORDON, A. S. Cellular and molecular neurociense of alcoholism. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1-20, 1997.

GOBETTO, A. *et al.* Cell proliferation in the post natal and adult mammalian central nervous system. **IT. J. Anat. Embryol.**, v.100, n. 1, p. 167-175, 1995..

HAMOUDI, W. H; IQBAL, Z.; SZE, P. Y. Acute and chronic actions of ethanol on endogenous camodulin content in synaptic plasma membranes from rat brain. **Biochem. Pharm.**, v. 49, p. 777-784, 1995.

JAVAHERI, S.; CORBETT, W. Ethanol is a potent inhibitor of canine cerebrospinal fluid production: an acute and reversible effect. **Brain Res.**, v. 812, p. 91-96, 1998.

MARIN-PADILLA, M. The chandelier cell of the human visual cortex: a Golgi study. **J. Comp. Neurol.**, v. 256, n. 1, p. 61-70, 1987.

MARIN- PADILLA, M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitetonics: a unifying theory. **J. Comp. Neurol.**, v. 321, p. 223-240, 1992.

MILLER, M.W. Migration of neurons I altered by gestacional exposure to ethanol. **Alcholism: Clin. And Exp. Res.,** v. 17, p. 304-314, 1993.

PORRINO, L. J.; WHITLOW, C. T.; SAMSON, H. H. Effects of the self-administration of ethanol and ethanol/sucrose on rates of local cerebral glucose utilization in rats. **Brain Res.**, v. 791, p. 18-26, 1997.

SESSLER, F. M. *et al.* Effects of ethanol on rat somatosensory cortical neurons. **Brain Res.**, v. 804, p. 266-274, 1998.

SUPER, H.; SORIANO, E.; UYLINGS, H.B. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. **Brain Res.**, v. 27, n. 1, p. 40-64, 1998.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S. ; CAVINESS JR., V. S. The Leaving or Q Fraction of the Murine Cerebral Proliferative Epithelium: A General Model of Neocortical Neurogenesis. **J. Neurosc.**, v. 16, n. 19, p. 6183-6196, 1996.

VIZI, S.; PALFI, A.; GULYA, K. Multiple calmodulin genes exhibit systematically differential responses to chronic ethanol treatment and withdrawal in several regions of the rat brain. **Mol. Brain Res.**, v.83, p.63-71, 2000.