

ANÁLISE ALOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DO HIPOCAMPO E CORPO CALOSO DE RATO.

Tuany Caroline Bernardi (PIBIC//FA), Silvana Regina de Melo (Orientador),
e-mail: srmelo@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá - Centro de Ciências Biológicas/
Maringá/Pr

Ciências Biológicas – Morfologia

Palavras-chave: Golgi-Cox, Kluver-Barrera e mielina.

Resumo:

Conhecer a capacidade da técnica em marcar a estrutura que se quer estudar e ter domínio dela é fundamental na pesquisa científica. No presente trabalho o objetivo foi padronizar as técnicas de Klüver-Barreira para evidenciar feixes da bainha de mielina e corpos celulares, e Golgi-Cox, para evidenciar neurônios com suas espinhas dendríticas. Associado à qualidade da técnica de evidenciação, outro passo importante na pesquisa científica é o método de quantificação (Alometria e Estereologia). Observamos peculiaridades técnicas que auxiliaram na melhor execução e evidenciação do material. Considerando a dificuldade em dispor de meios adequados ao estudo dos neurônios, os dados analisados mostraram-se adequados quantitativamente e qualitativamente. Com isso, padronizamos técnicas valiosas que possibilitarão melhor aprofundamento no estudo neurocientífico.

Introdução

Dentre as técnicas histológicas que garantem visualização de neurônios destacam-se a técnica de Golgi, valiosa na observação das espinhas dendríticas (Gibb e Kolb, 1998), e a proposta por Klüver e Barrera (Klüver e Barrera, 1953), que introduziram o corante *Luxol fast blue* para visualizar fibras mielínicas. Outra ferramenta importante é o método de quantificação, a determinação do volume de estruturas cerebrais internas (Mandarim-de-Lacerda, 1995). A descrição de técnicas histológicas na literatura não é garantia de sucesso para todos os laboratórios devido a detalhes importantes, nem sempre mencionados. Portanto, o objetivo deste estudo foi padronizar em nosso laboratório a técnica de Golgi-Cox para evidenciar as espinhas dendríticas e de Klüver-Barrera contra-corado com violeta cresil para identificar e analisar hipocampo e corpo caloso. Em seguida empregar os adequados métodos de quantificação com equipamentos disponíveis nesta Instituição para análise das espinhas

dendríticas (Golgi-Cox), volume do hipocampo e corpo caloso e análise de seus elementos celulares.

Materiais e métodos

Foram utilizados 3 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*). Os procedimentos foram realizados de acordo com Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo 108/2012).

Etapas do processamento dos cérebros:

1) *Pré-fixação:* Cada animal foi anestesiado (Tiopental 100 mg + Lidocaína 10 mg/kg, i.p., 0,1 mL/100 pc) e submetido à perfusão intracardíaca. Para técnica Klüver-Barrera utilizou-se solução salina 0,9% seguido de solução de paraformaldeído 4% e para Golgi-Cox foi utilizado apenas solução salina 0,9%. Os cérebros foram dissecados e pós-fixados.

2) *Pós-fixação:* Para a técnica de Klüver-Barrera utilizou-se solução de paraformaldeído 4% durante 48 horas, e para Golgi-Cox foram pós-fixado em solução de Golgi por 20 dias.

3) *Crioproteção e Congelamento:* Os cérebros foram imersos em solução de sacarose 30% e permaneceram até completa precipitação (8 dias). Em seguida foram congelados cuidadosamente por meio da imersão do cérebro em Becker de vidro contendo 40 ml solução de isopentano e nitrogênio líquido.

4) *Microtomia e Impregnação do tecido:* Para técnica de Golgi-Cox foi obtido secções coronais com 100 µm e a partir da primeira secção considerada, uma a cada cinco foi coletada aleatoriamente e disposta cuidadosamente sobre a lâmina. Para técnica de Klüver-Barrera foi obtido secções com 40 µm e após o primeiro corte coletado aleatoriamente, cada 5ª secção foi coletada e disposta sobre lâmina.

Resultados e Discussão

A Impregnação do tecido nervoso pela técnica de Klüver-Barrera permitiu a observação da bainha de mielina e núcleos celulares (fig. 1A e B). Logo após a microtomia os cortes congelados foram secos em estufa a 37°C. Clareados em xilol. Hidratados em concentrações decrescentes de álcool. Imersos em cuba contendo solução de *Luxol fast blue*. Mergulhados na seguinte sequencia de cubas contendo, álcool 95%, água destilada, solução de carbonato de lítio 0.05% e álcool 70%. Nestas duas últimas etapas ocorreu a diferenciação e o tom de azul da substância branca destaca-se no tecido em contraste com a falta de coloração dos locais de substância cinzenta. Em seguida colocou-se em cuba contendo solução de violeta cresil 0.1%. Mergulhou-se em água destilada e em seguida

desidratou-se com sequência crescente de álcoois e sequencialmente clareados em xilol.

A Impregnação do tecido nervoso pela técnica de Golgi-Cox permitiu a observação de dendritos e espinhas dendríticas (fig. 1 C). O protocolo apresenta duas fases, escuro e claro, onde na fase de escuro as lâminas devem estar completamente protegidas da luz e em capela. Na fase escuro o berço de lâminas previamente preparadas é colocado na seguinte sequência de cubas: água destilada; solução de amônia; água destilada; solução de rapid fix. Na fase claro o berço de lâminas não precisa de proteção contra luz foi colocado na seguinte sequência de cubas: duas vezes em água destilada; sequência crescente de álcoois e clareados em xilol. Após várias tentativas, concluímos que o protocolo estabelecido para as duas técnicas é viável para ser desenvolvido em nosso laboratório e analisado nas condições de equipamentos que temos disponíveis na Universidade Estadual de Maringá. A qualidade de imagens obtidas com a técnica possibilitará a análise quantitativa (em processamento) e permitirá o estudo destas importantes e outras áreas cerebrais.

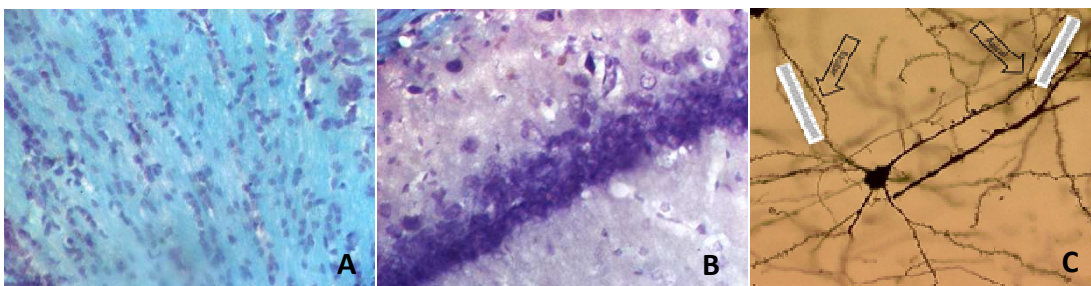


Figura 1 – Método Kluver-Barrera, objetiva de 100x. Feixes de mielina no Corpo Caloso (A); Camada granular do hipocampo (B). Método de Golgi-Cox, objetiva de 100x. Neurônio piramidal do hipocampo e ramificações dendríticas com espiculas dendríticas (C).

Conclusões

Após várias tentativas, concluímos que o protocolo estabelecido para as duas técnicas é viável para ser desenvolvido em nosso laboratório e analisado nas condições de equipamentos que temos disponíveis na Universidade Estadual de Maringá. A qualidade de imagens obtidas com a técnica possibilita a análise quantitativa (em processamento) e permitirá o estudo destas importantes e outras áreas cerebrais.

Agradecimentos

Fundação Araucária, departamento de Ciências Morfológicas em especial à Profª Drª Silvana Regina de Melo.

Referências

- GIBB, R.; KOLB, B. A method for vibratome sectioning of Golgi–Cox stained whole rat brain. **Journal of neuroscience methods**, v. 79, n. 1, p. 1-4, 1998.
- KLUVER, H; BARRERA, E.A. A method for the combined staining of cells and fibres in the nervous system. **J Neuropathol**, v. 12, p. 400-413, 1953.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Eduerj, 1995.