ANTÓNIO CADETE LEITE

EFEITOS DA ALCOOLIZAÇÃO CRÓNICA E DA ABSTINÊNCIA SOBRE A FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO E O CÓRTEX PRELÍMBICO DO RATO ADULTO

ESTUDO MORFOMÉTRICO

PORTO 1988

EFEITOS DA ALCOOLIZAÇÃO CRÓNICA E DA ABSTINÊNCIA SOBRE A FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO E O CÓRTEX PRELÍMBICO DO RATO ADULTO

ESTUDO MORFOMÉTRICO

Ao Excelentíssimo Senhor Reitor da Universidade do Porto, Professor Alberto Amaral, com cumprimentos respeitosos

ANTÓNIO CADETE LEITE

e os protestos da mais elevada consideração.

Esta a simples homenagem de mais um doutor pela U.P., do grupo do Professor Manuel Paula-Barbosa.

A. Cadete Leite

EFEITOS DA ALCOOLIZAÇÃO CRÓNICA E DA ABSTINÊNCIA SOBRE A FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO E O CÓRTEX PRELÍMBICO DO RATO ADULTO

ESTUDO MORFOMÉTRICO

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO 1988

Publicação subsidiada pelo Instituto Nacional de Investigação Científica

CORPO CATEDRÁTICO
DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Efectivos

Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor António Fernandes de Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge da Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim de Oliveira da Costa Maia
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando de Barros Castro Correia
Doutor José Manuel da Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves de Pina Cabral

Doutor José Pinto de Barros
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Fonseca Pinheiro Coelho Hargreaves
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques e Magalhães
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Professores Jubilados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor António Martins Gonçalves de Azevedo
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Eduardo Esteves Pinto
Doutor João Costa
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões

Artigo 48º, parágrafo 3 - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto - Decreto nº 19.337, de 29 de Janeiro de 1931).

O Decreto-Lei nº 388/70, Art. 8º, parágrafo 2, refere:

"É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento, total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados, mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal".

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos, já publicados ou submetidos para publicação:

1. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M. M., Gray, E.G., 1986. "Perforated" synapses in frontal cortex of chronic alcohol-fed rats. J. Submicrosc. Cytol., 18, 495-499.

2. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Pacheco, M.M., Pinho, M.C., Cadete-Leite, A., 1987. Stereological study of the rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses after long-term alcohol consumption and withdrawal. Soc. Neurosci. Abstr., 13, 75.

3. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M. M., 1988. Alcohol withdrawal does not impede hippocampal granule cell progressive loss in chronic alcohol-fed rats. Neurosci. Lett., 86, 45-50.

4. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Uylings, H.B.M., Paula-Barbosa, M.M., 1988. Granule cell loss and dendritic regrowth in the hippocampal dentate gyrus of the rat after chronic alcohol consumption. Brain Res., 473, 1-14.

5. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Pacheco, M.M., Volk, B., Paula-Barbosa, M.M.. Hippocampal mossy fiber-CA3 synapses after chronic alcohol consumption and withdrawal. Submetido para publicação.

6. Cadete-Leite, A., Alves, M.C., Tavares, M.A., Verwer, R.W.H., Paula-Barbosa, M.M.. Effects of chronic alcohol consumption and withdrawal in the prefrontal cortex of the adult rat. I. Neuronal and synaptic densities. Submetido para publicação.

7. Cadete-Leite, A., Alves, M.C., Paula-Barbosa, M.M., Uylings, H.B.M., Tavares, M.A.. Effects of chronic alcohol consumption and withdrawal in the prefrontal cortex of the adult rat. II. Three dimensional analysis of pyramidal cells. Submetido para publicação.

8. Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., Uylings, H.B.M., Paula-Barbosa, M.M.. Metric analysis of hippocampal granule cells dendritic trees after alcohol withdrawal in the rat. Submetido para publicação.

A contribuição pessoal nestes trabalhos foi a seguinte:

a) Nos trabalhos 1, 3, 4, 6 e 8: contribuição importante na sua concepção; obtenção e estudo de grande parte do material; análise dos resultados; redacção da primeira versão do manuscrito.
b) Nos trabalhos 2 e 5: contribuição na sua concepção; obtenção de parte do material; análise de parte dos resultados; colaboração na elaboração do manuscrito.
c) No trabalho 7: obtenção da totalidade do material; colaboração na análise dos resultados; participação na elaboração do manuscrito.

À memória de meus Pais
e de
Meus irmãos Alberto e Maria Rosa

A minha Mulher
A meus Filhos
A minha neta Kali

A contribuição que neste estudo se apresenta para melhor conhecimento científico dos efeitos da alcoolização crónica, e fundamentalmente das consequências da supressão do etanol após períodos prolongados da sua ingestão, sobre a organização estrutural do sistema nervoso central do Rato adulto, resume o trabalho de quatro anos de intensa actividade de pesquisa, distribuída por múltiplos campos de aplicações metodológicas diversas.

Seria tão desconcertante como injusto atribuír-me a exclusividade do trabalho realizado e, além disso, não recordar todos quantos - há muitos anos ou mais recentemente - me conduziram no hábito do raciocínio científico e na prática da investigação experimental, conciliados com o espírito de competência e dedicação exigido pelo correcto exercício das funções docentes.

Apresento esta dissertação de candidatura ao grau de doutor volvidos mais de vinte e cinco anos após a minha licenciatura. Longo período de tempo recheado de ricas e inesquecíveis vivências à mistura com outras de sabor menos agradável, foi preenchido por continuada actividade docente, pelo labor possível no campo da investigação e por múltiplas tarefas no domínio universitário e no sector da saúde. Mas ao olhar para trás, é com tranquilidade de consciência e sentimento de dever cumprido que vejo o extenso caminho percorrido.

É ao Professor Doutor Manuel de Mello Adrião, perante a memória de quem muito respeitosamente me inclino, que devo o ingresso na carreira docente desta Faculdade, em 1961. Embora o período de contacto com este Professor tivesse sido curto, impressionou-me a sua invulgar personalidade, em que a humildade se aliava a alto sentido de dignidade e cuja missão universitária assentava em sólida formação no campo da biologia, para cujos fenómenos nunca deixava de procurar interpretação filosófica.

Aliás, pouco depois, encontrei no Professor Doutor Abel Sampaio Tavares a continuidade deste espírito, em que a simplicidade e humildade da sua conduta não conseguem encobrir uma profunda formação humanística e científica. Muito reconhecidamente agradeço as orientações e conselhos recebidos, ao longo de vários anos, do Professor Abel Tavares, de quem sempre ouvi a palavra certa no momento oportuno.

Não posso esquecer o longo período de tempo que, em Angola, trabalhei com o Professor Doutor Nuno Rodrigues Grande. Se algumas vezes divergências de opinião nos colocaram em situações opostas, sempre a compreensão e respeito mútuos nos conduziram ao entendimento sensato e conciliador. Sob sua orientação iniciei trabalhos de investigação que poderiam ter aberto caminho para a elaboração da minha dissertação de doutoramento mas

que, de facto, não se coadunavam com as minhas aptidões e aspirações. A confiança que em mim depositou quer no compartilhar de funções docentes quer ao consentir a realização de trabalhos de investigação independentes, é ainda hoje oportuno reconhecer e agradecer.

Ao Professor Doutor Joaquim Pinto Machado devo, entre muito mais, o despertar do interesse que em mim cresceu pela embriologia e pela teratologia experimental. O seu entusiasmo e competência pelos fenómenos do desenvolvimento pré-natal e seus desvios, incutiram-me o gosto pelo seu estudo que viria a constituir tema para a dissertação cujos trabalhos iniciei neste Instituto em 1969, sob sua orientação. Tal convivência com o Professor Pinto Machado, prolongada depois em Angola e mais recentemente aqui no Porto, permitiu confirmar o respeito e a admiração que desde o início dos nossos contactos me mereceu. Fico-lhe ainda agradecido pela atenção dedicada e o espírito crítico com que reviu o manuscrito da presente dissertação.

Foi naquela passagem pelo Porto que me iniciei nas técnicas de microscopia electrónica. Agradeço aos Professores Doutores Manuel Teixeira da Silva e Alexandre Sousa Pinto e ao Dr. Rui Abrunhosa, aos quais devo tal aprendizagem.

Quando parte do manuscrito da dissertação acima referida, sobre o desenvolvimento pré-natal do pâncreas endócrino no Murganho, estava numa primeira versão, surgiu o 25 de Abril de 1974. A agitação que então se viveu e a minha decisão de permanecer em Angola por mais algum tempo, não permitiram que o trabalho fosse concluído.

Foi com gratificante satisfação que, em 1984, após o meu regresso a Portugal, verifiquei que os Professores Doutores Joaquim Pinto Machado e Alexandre Sousa Pinto me franqueavam as portas do Instituto de Anatomia. Tal atitude, que reconhecidamente agradeço, tornou possível que prosseguisse a minha vida docente e retomasse a actividade de investigação. Não posso deixar de igualmente expressar a minha gratidão aos Professores Pinto Machado e Paula Barbosa pelo modo como então me incitaram para a realização da dissertação de doutoramento.

Quase de imediato o Professor Doutor Manuel Paula Barbosa me integrava no grupo de investigadores que trabalhavam no projecto "Circuitos Nervosos na Hiponutrição e Alcoolismo Crónicos" da Linha de Acção nº 5 do Centro de Morfologia Experimental da Universidade do Porto (INIC) e me sugeria o tema da presente dissertação. Se com o Professor Paula Barbosa aprendi a metodologia laboratorial no campo da investigação neuro-anatómica, mais

lhe fico a dever o facto de, realmente, ter sido o arquitecto e grande obreiro do projecto desta dissertação. Os seus conselhos oportunos, as suas orientações perspicazes e o seu apurado espírito crítico muito influíram na sua elaboração e na redacção do seu manuscrito. Para além de tudo, a amizade e respeito mútuos que entre nós se estabeleceram constituíram um marco que caracterizou indefectivelmente o início de uma nova fase da minha vida universitária. Por tudo isto, e muito mais, o meu sincero e amigo reconhecimento.

À Professora Doutora Maria Amélia Tavares agradeço, antes de tudo, o ter aceite a orientação desta dissertação. Dominando as mais recentes técnicas da metodologia morfométrica, instrumento indispensável para a concretização deste estudo, prontamente me iniciou na sua aprendizagem. Desde a forma incansável como permanentemente acompanhou todo o trabalho até à participação activa em algumas das suas partes, incluindo a análise estatística dos resultados, tudo são motivos para a expressão dos meus sinceros agradecimentos.

Agradeço também aos Professores Harry Uylings e Ronald Verwer o auxílio dispensado no tratamento dos resultados quantitativos sobre a análise dendrítica e o estudo sinaptológico, realizados no Netherlands Institute for Brain Research.

Ao Professor Doutor Joaquim Maia fico agradecido pela orientação prestada sobre o emprego dos métodos estatísticos utilizados.

Ao Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões agradeço as facilidades concedidas para a utilização do MOP AMO1 e, principalmente, o interesse com que acompanhou todo o trabalho realizado.

Também ao Professor Doutor António Coimbra desejo agradecer a forma como me recebeu quando procurado para esclarecimentos indispensáveis.

Aos Colegas do Instituto de Anatomia que de um modo ou de outro me auxiliaram na elaboração deste trabalho aqui deixo, a todos, o meu muito obrigado. Mas não posso deixar de reconhecer de modo particular a ajuda inestimável das Dras. Maria Dulce Madeira, Maria Cristina Alves e Branca Orfão.

Quero ainda testemunhar a minha gratidão pelo empenho de todo o pessoal técnico do Instituto de Anatomia, sem a colaboração do qual a realização deste trabalho não teria

sido possível. No entanto, não ficaria de consciência tranquila se não destacasse a participação da D. Maria Cecília Pinho e da D. Maria Manuela Pacheco.

Igualmente agradeço a disponibilidade e ajuda do pessoal da Secção de Microscopia Electrónica da Faculdade de Medicina do Porto.

Agradeço ainda ao Instituto Nacional de Investigação Científica, à Fundação Calouste Gulbenkian e à Stiftung Volkswagenwerk (Projecto I-63945), instituições cujo apoio foi indispensável à realização e publicação do presente trabalho.

Finalmente, espero que minha mulher e meus filhos se sintam, tal como eu me sinto, compensados de todos os sacrifícios de muitos anos e experimentem a satisfação de que valeu a pena todo o apoio que me proporcionaram.

INTRODUÇÃO

O alcoolismo crónico continua a ser um grave problema de saúde pública comum a todas as sociedades contemporâneas (359). Embora com repercussões de ordem variável conforme a sociedade em causa, é um flagelo universal há muito englobado no contexto geral da problemática do consumo da droga já que o álcool é susceptível de causar dependência e tolerância psíquicas. Tendo ainda em vista a dependência física que igualmente provoca, o alcoolismo é desde o século passado quase unanimemente considerado uma doença (29,109, 134,359). É este o conceito proposto pela Organização Mundial de Saúde (359) que recomenda a substituição do termo alcoolismo pelo de "drogo-dependência de tipo alcoólico" (109) e considera esta situação quando o consumo de álcool por um indivíduo excede os limites aceitáveis pelas normas culturais da sociedade a que pertence ou se torna tão elevado que lese a saúde ou prejudique as relações sociais do indivíduo (189). Por outro lado, a Associação Psiquiátrica Americana considera situação de alcoolismo sempre que a quantidade de álcool ingerida seja suficiente para prejudicar o estado de saúde física do indivíduo ou alterar o seu comportamento pessoal ou social, ou se torne condição indispensável ao seu comportamento normal (189).

Se bem que o consumo crónico e excessivo de álcool provoque alterações patológicas em quase todos os orgãos da economia, está demonstrado que o sistema nervoso humano é dos sectores mais afectados sendo múltiplas e variadas as alterações morfológicas e funcionais induzidas por esta situação (52,53,71,104,105,111,132,177,180,213,271,293,332-334).

Assim se compreende que desde o trabalho pioneiro de Courville (71), que em 1955 mostrou haver atrofia dos lobos frontais ao fazer o estudo necrópsico de encéfalos de alcoólicos crónicos e logo depois de Victor e col. (334), em 1959, que em observações do mesmo tipo verificaram a existência de alterações da estrutura do cerebelo, se tivesse procurado conseguir modelos animais de alcoolização capazes de permitir o estudo morfológico dos efeitos do etanol sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Designadamente, tais modelos deveriam garantir, na medida do possível, que os resultados obtidos não fossem influenciados por factores concomitantes, como as deficiências de nutrição por carências proteicas e vitamínicas (166,185,196, 286,332,363), que habitualmente acompanham as situações de consumo crónico do álcool. Para o animal adulto, esse modelo foi pela primeira vez conseguido por Riley e Walker (250) em 1978 no Murganho, em que os animais de experiência eram nutricionalmente controlados, e no qual descreveram acentuada redução do número de neurónios no hipocampo, após 5 meses de tratamento pelo álcool etílico seguidos de 2 de abstinência.

A partir de então vários grupos de investigadores se têm dedicado ao estudo dos efeitos da alcoolização experimental sobre o SNC, embora a maioria analise essencialmente as consequências de ordem fisiológica, bioquímica e psicológica (2,3,4,95,118,145,152,204,259, 306,342-344).

No âmbito do estudo das alterações morfológicas, destacam-se os trabalhos do grupo do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto que, a partir também de 1978, muito têm contribuído para o esclarecimento dos efeitos tóxicos do etanol no SNC do Rato adulto, quer aprofundando conhecimentos relativos a determinadas áreas do SNC quer ampliando o âmbito da investigação a outras regiões deste sistema (15,36,49,216-218,221,290-292,294-304). Pela primeira vez estes estudos foram realizados num modelo em que se utilizaram períodos mais prolongados de alcoolização que os empregues por outros autores e complementados, mais recentemente, pela inclusão de grupos de abstinência, igualmente de longa duração, de animais previamente sujeitos a alcoolização crónica (49).

No estudo das consequências de natureza morfológica verificadas no SNC pela acção do álcool são de realçar ainda os trabalhos de Riley e de Walker e col. (249,250,345-348) e os de Phillips e Cragg (237-241) no cerebelo e na formação do hipocampo de roedores e ainda os de outros autores que pontualmente abordam o mesmo tipo de efeitos sobre estas e outras áreas do SNC (153,165,168,169,186,227,242,338,339). Como denominador comum a estas investigações morfológicas constata-se a presença de marcados sinais degenerativos traduzidos por morte celular e empobrecimento das arborizações dendríticas das células sobreviventes à acção do álcool, com as consequentes implicações no normal funcionamento dos circuitos neuronais.

Ao longo dos últimos dez anos os trabalhos realizados neste Instituto com o referido modelo experimental tiveram por objectivo o estudo mais pormenorizado dos efeitos da alcoolização prolongada sobre o SNC. As primeiras investigações incidiram sobre o cerebelo não só porque nesta estrutura se centrava então a maioria dos estudos do referido grupo de investigadores (214,215,219,225,255-257) mas também porque se sabia que o cerebelo é uma das áreas do SNC mais vulneráveis ao etanol (71,334). Assim, no córtex cerebeloso do Rato adulto submetido a alcoolização crónica, foram encontradas profundas e variadas alterações morfológicas traduzidas qualitativamente e quantitativamente num conjunto de modificações degenerativas tanto ao nível dos somas celulares como dos seus prolongamentos (216-218,290, 292,298,300,301,304). A par destas alterações foram também notados sinais de remodelação estrutural que evidenciaram a conservação das capacidades plásticas do córtex cerebeloso mesmo durante os períodos prolongados de consumo de álcool (290,296,297,299,301,302). A análise global dos resultados então obtidos permitiu concluir que a organização morfológica do circuito cerebeloso era profundamente afectada pela acção prolongada do álcool.

Depois de analisados os efeitos do álcool sobre a referida estrutura, possuidora dum circuito nervoso relativamente simples e cujas conexões são bem conhecidas, prosseguiram-se os estudos tentando-se averiguar se a conectividade neuronal de circuitos mais complexos eram também sede de idênticas alterações estruturais após a acção do etanol e simultaneamente avaliar as potencialidades plásticas dos diferentes elementos destes circuitos nestas circunstâncias experimentais. Assim, primeiramente estudou-se a formação do hipocampo, área do SNC onde já haviam sido demonstrados efeitos degenerativos consequentes ao consumo do álcool (168,249,250,345,348), e, mais tarde, o córtex prefrontal onde os efeitos da alcoolização crónica não tinham sido ainda averiguados.

Os primeiros estudos daqueles efeitos sobre a formação do hipocampo efectuados no

Instituto de Anatomia, usando o modelo experimental referido, mostraram que, de modo idêntico ao encontrado no cerebelo (217,294,303), as pirâmides do hipocampo apresentavam aumento precoce e progressivo da deposição de lipofuscina (36,37) conjuntamente com a presença de corpos multivesiculares gigantes (221). Mais tarde, ao iniciar-se o estudo da área prelímbica do córtex prefrontal medial nas mesmas circunstâncias experimentais, igualmente se encontrou aumento da deposição daquele pigmento, para além de outras alterações do sistema lisosómico (49).

É de salientar ainda que estas alterações nas células piramidais do córtex prelímbico verificadas após longos períodos de alcoolização permaneciam mesmo após abstinência alcoólica também de longa duração (49). Este achado e a circunstância de se encontrarem na literatura resultados controversos na quantificação de alguns parâmetros morfológicos dos circuitos neuronais após períodos de abstinência (186,238,240,241,345) impunham, por si só, um estudo dos efeitos da supressão do álcool nestas áreas do SNC. Como além disso a abstinência alcoólica é uma vertente importante na avaliação dos efeitos do álcool sobre o SNC (142,183,184,274), também em animais sujeitos a abstinência se procedeu a análise tão exaustiva quanto a efectuada nos animais alcoolizados.

Assim, realizaram-se nos animais submetidos a abstinência estudos do mesmo tipo e nas mesmas estruturas que se analisaram nos animais sujeitos unicamente a alcoolização crónica, o que possibilitou a caracterização morfológica das consequências da supressão do etanol após períodos prolongados da sua administração.

A selecção das duas áreas referidas fundamentou-se em razões de vária ordem. No respeitante à formação do hipocampo, não só é uma região do SNC implicada nas actividades afectivas e cognitivas com papel importante nos fenómenos de aprendizagem e memória (23,63,64,131,144,146,150,205,208,254,277), mas também apresenta uma organização estrutural relativamente simples e bem definida (13,16,32,33,146,178,264) o que facilita a avaliação quantitativa de eventuais alterações morfológicas de que possa ser objecto pelo tratamento pelo álcool. Na verdade, a zona da formação do hipocampo escolhida para estes estudos enquadra-se num conjunto de três regiões sinapticamente interligadas - a área denteada e os campos CA3 e CA1 do hipocampo - que se integram num circuito trissináptico com início essencialmente nas células entorrinais cujas aferências atingem as células granulares; estas, através dos seus axónios - as fibras musgosas -, estabelecem sinapses com as células piramidais de CA3 as quais, pelos colaterais de Schaffer, se conectam com as pirâmides de CA1; os axónios destas últimas células piramidais, participando na constituição do álveo, atingem o complexo subicular e o córtex entorrinal (13,136,137,144,146,179,277,285) origens das principais eferências do hipocampo para estruturas subcorticais, límbicas e corticais (146,277,285) através do sistema fímbria-fórnice e fibras de associação intracortical (146,283).

Relativamente ao córtex prefrontal medial (157-159) sabe-se que nos roedores corresponde ao córtex prefrontal do Homem, homologia definida pelas projecções que recebe do núcleo medial dorsal do tálamo (24,119,133,154,157,167,185,319,320,337). Por outro lado, está demonstrado que o córtex prefrontal medial tem importantes implicações funcionais, estando envolvido num vasto leque de manifestações comportamentais (45,154,190,193,205), com papel relevante nos fenómenos de aprendizagem e na memória (154,155,261).

A área do córtex prefrontal medial seleccionada para o presente estudo foi a área prelímbica. Esta área integra um circuito no qual predominam as aferências do núcleo medial dorsal do tálamo (24,154,157,319) e cujas eferências projectam para as áreas corticais entorrinal e pré-subicular (154); são ainda conhecidas outras conexões com o sistema límbico (246), nomeadamente as projecções que recebe do hipocampo (103,144,284). Para além disso,

embora todo o córtex prefrontal medial do Rato represente uma zona cortical de padrão cito-arquitectónico simples e de transição para o padrão neocortical de seis camadas (157,159,253, 319,321) a área prelímbica é a que apresenta definição laminar cortical mais evidente (133, 253,319,321).

Ao caracterizar quantitativamente alguns dos constituintes estruturais dos dois circuitos neuronais referidos, bem como as conexões que entre si estabelecem, procurou-se averiguar quais as repercussões da alcoolização crónica e da abstinência ao nível de um circuito mais amplo que integra aqueles, o circuito córtico-límbico-tálamo-cortical (195), de grande importância funcional e essencialmente relacionado com os fenómenos de memorização.

Nesta perspectiva, em grupos de animais sujeitos a alcoolização crónica, seguida ou não de abstinência, e respectivos controlos, no que à formação do hipocampo diz respeito, estudaram-se:

1. *Em cortes semifinos*

1.1. as espessuras da área denteada e das camadas granular e molecular da fáscia denteada e da camada piramidal de CA3 do hipocampo;

1.2. as densidades numéricas das células granulares da fáscia denteada e das células piramidais de CA3.

2. *Em cortes impregnados pela prata, as células granulares*

2.1. analisando metricamente as suas arborizações dendríticas e determinando a densidade das espinhas dendríticas;

2.2. caracterizando topologicamente estas mesmas arborizações.

3. *Em cortes ultrafinos do estrato lúcido, determinando*

3.1. a fracção volumétrica dos terminais das fibras musgosas (TFM);

3.2. a densidade numérica das sinapses entre estes terminais e as células piramidais de CA3;

3.3. a fracção de plasmalema dos mesmos terminais ocupada por zonas activas.

Nos mesmos grupos experimentais, mas no respeitante ao córtex prelímbico, estudaram-se:

1. *Em cortes semifinos*

1.1. a espessura das camadas corticais I-III;

1.2. a densidade numérica das células piramidais da camada III.

2. *Em cortes impregnados pela prata, as células piramidais da camada III*

2.1. analisando metricamente as suas arborizações dendríticas basais e determinando a densidade das espinhas dendríticas;

2.2. caracterizando, em termos topológicos, estas arborizações.

3. *Em cortes ultrafinos da camada III, o neurópilo determinando*

3.1. as fracções volumétricas dos terminais axonais e dos prolongamentos gliais;

3.2. a densidade numérica das sinapses axodendríticas e axospinhosas;

3.3. o diâmetro e área médios dos discos sinápticos;

3.4. o número de sinapses por neurónio.

Em resumo, teve-se por objectivo, ao analisar os parâmetros estruturais acima discriminados e que constituem elos relevantes no circuito trissináptico da formação do hipocampo e no da camada III do córtex prelímbico do Rato, obter informações que contribuíssem para a compreensão dos défices morfofuncionais consequentes à alcoolização crónica e à abstinência.

Deste modo, e numa perspectiva mais genérica, procurou-se contribuir ainda para a elucidação do candente problema da caracterização dos aspectos dinâmicos da resposta do SNC a situações de agressão crónica e aos efeitos dessas agressões mesmo que terminadas, cujo resultado depende da interacção entre os fenómenos degenerativos e a actividade reorganizativa que constantemente se faz sentir no SNC.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS E DIETAS

Todas as observações constantes deste estudo foram efectuadas em ratos da estirpe *Sprague-Dawley* provenientes do Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, em Oeiras, ou seus descendentes nascidos e criados no Biotério do Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto*.

Utilizou-se um total de 48 animais machos, divididos em 8 grupos de 6, que às 8 semanas de idade - início da experiência - foram colocados em gaiolas individuais, dispondo da dieta de laboratório apropriada. Os animais de 5 destes grupos foram submetidos a alcoolização durante 6 (2 grupos), 12 (2 grupos) e 18 meses, enquanto que os restantes 3 grupos constituíram controlos durante aqueles mesmos períodos de tempo (Fig.1).

Os protocolos de alcoolização dos animais e de substituição isocalórica do álcool nos controlos, bem como de complementação dietética em sais e vitaminas, obedeceram às normas seguidas como rotina neste modelo experimental estabelecido no Instituto de Anatomia e que têm sido referidas em trabalhos anteriores (49,290,298,300,301). Os animais a alcoolizar dispunham de um único tipo de bebida constituído por uma solução aquosa de etanol (*Merck*) a 20% que continha, tal como a água fornecida aos controlos e aos que entraram em abstinência, 300 mg/100 ml de suplementos vitamínicos (*Vitamin Diet Fortification Mixture, ICN Nutritional Biochemicals Cleveland*) e 500 mg/100 ml de sais minerais (*Salt Mixture XIV, ICN Cleveland*) (348).

Nos animais em alcoolização foi diariamente determinado o peso dos alimentos sóli-

---

* Impõe-se uma referência sobre a estirpe dos ratos utilizados no presente estudo.

Tomou-se conhecimento de que, quando em 1978 se iniciou a linha de investigação em que se enquadra este trabalho, foi contactado naquele sentido o responsável pelo Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência que informou tratar-se de uma estirpe *Sprague-Dawley* de proveniência desconhecida. Esta mesma informação foi corroborada pelo mesmo Biotério em 1984 e estudos do tipo de foliação do vermis cerebeloso efectuados neste Instituto de Anatomia estão de acordo com tal afirmação. No início de 1987 os animais enviados por aquele Biotério passaram a mostrar características morfológicas diferentes, nomeadamente ponderais. Foi então comunicado pelos responsáveis do Biotério tratar-se de uma nova linhagem de animais da mesma estirpe para aliviar os efeitos de *inbreeding* que se haviam começado a fazer sentir. Recentemente, o mesmo Biotério informou tratar-se da estirpe *Wistar* e não *Sprague-Dawley*. Este facto em nada afecta os resultados deste trabalho pois todos os animais nele utilizados foram nascidos no Biotério do Instituto de Anatomia ou recebidos antes de 1987. São, pois, todos pertencentes à primeira das estirpes referidas.

dos ingeridos e o volume de solução alcoólica consumida. No dia seguinte fornecia-se aos animais testemunha uma quantidade de alimentos sólidos correspondente à média dos pesos (g/dia) de alimentos ingeridos no dia anterior pelos animais alcoolizados e acrescentava-se à água de bebida uma quantidade de sacarose que perfizesse o número de calorias (1 g de sacarose - 5 Kcal) correspondente às recebidas através do álcool (1 g de etanol - 7 Kcal) pelos animais em alcoolização. Estes cálculos basearam-se no consumo de álcool em gramas (1 dl de etanol - 7,9 g) por quilograma de peso de animal e por dia (290).

Do total dos 12 animais de cada um dos grupos alcoolizados durante 6 e 12 meses, 6 foram sacrificados no fim do período de alcoolização e os restantes submetidos a períodos de abstinência alcoólica de 6 meses, iniciada pela redução da concentração do álcool no líquido de bebida durante 2 semanas (solução aquosa a 10% na primeira semana e a 5% na segunda). A partir de então, o consumo de alimentos sólidos e de água passou a ser livre. Por comodidade, denominaram-se estes 2 grupos como de abstinência 1 e abstinência 2, conforme a duração do período de alcoolização tivesse sido de 6 ou 12 meses, respectivamente (Fig. 1).

A todos os animais estudados foi determinado quinzenalmente o peso corporal.

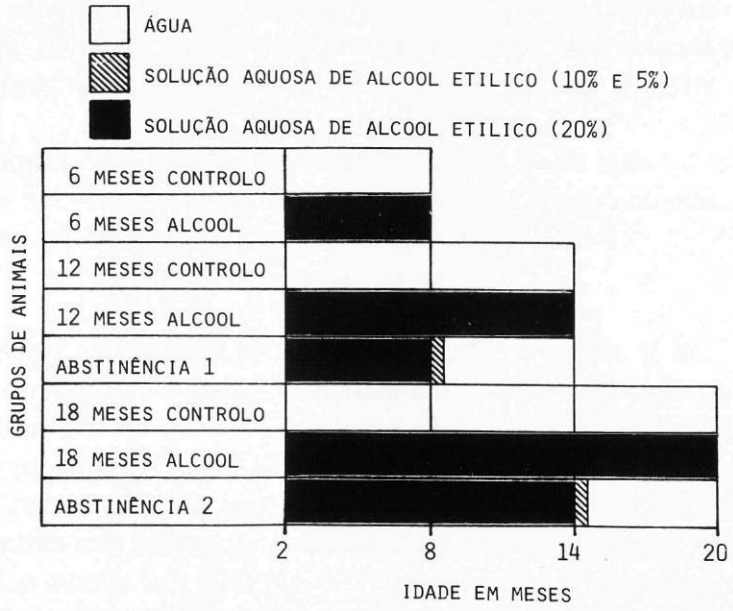


Fig. 1. Diagrama ilustrativo dos grupos de animais estudados e respectivos tipos de líquido ingerido durante o decurso dos diferentes períodos experimentais.

2. TÉCNICA DE PERFUSÃO. DISTRIBUIÇÃO GERAL E TRATAMENTO DO MATERIAL

Terminados os diferentes períodos de experimentação, todos os animais - alcoolizados, controlos e sujeitos a abstinência - foram perfundidos por via transcardíaca. A técnica de perfusão seguida e a solução fixadora utilizada foram idênticas às descritas por Palay e Chan-Palay (211) e de acordo com a rotina no Instituto de Anatomia. Parte do material usado no presente trabalho pertencia a animais utilizados para estudos da mesma índole noutras áreas do SNC.

A perfusão, após anestesia dos animais pelo éter, prolongava-se por 20 a 30 minutos e

o líquido fixador (300 a 400 ml/animal) era constituído por uma mistura de 1% de glutaraldeído e 1% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,12 M a pH 7,2, à qual se adicionava lidocaína na proporção de 0,4%.

Terminada a perfusão, procedia-se à abertura da cavidade craniana e à remoção do encéfalo. O cérebro era isolado por separação do cerebelo e do tronco cerebral, bem como do bolbo olfactivo, pesado e imerso, durante 2 horas, no líquido fixador.

Decorrido aquele tempo, os hemisférios cerebrais eram separados por corte mediosagital e em cada um deles retirava-se o córtex prefrontal (CPF) (24,90,157,158,167,319) por secção coronal passando um pouco atrás do joelho do corpo caloso (Fig. 2). Da porção restante de cada hemisfério, e por dissecção cuidadosa, isolava-se a formação do hipocampo (FH) (16) do neocórtex que a envolvia* (Fig. 3).

O CPF e a FH do hemisfério esquerdo destinavam-se à impregnação argêntica, enquanto as partes correspondentes do hemisfério direito seguiam os diferentes passos para observação ultrastrutural. Para este último fim, o CPF era seccionado seriadamente com uma lâmina, segundo o plano coronal, obtendo-se em média 5 fragmentos. A FH era também seccionada, perpendicularmente ao eixo septotemporal, seleccionando-se para estudo os cortes da sua porção mediotemporal (Fig. 3).

2.1. Método de Golgi

O CPF e a FH destinados à impregnação argêntica, permaneciam durante 7 a 10 dias mergulhados na solução fixadora, a uma temperatura de aproximadamente 4°C. Eram depois processados segundo uma modificação do método de Golgi-Stensaas (279) a que se chegou alterando a metodologia proposta por Eckenhoff e Rakic (96).

Os fragmentos a impregnar eram colocados durante 72 horas num soluto aquoso que continha, para 100 ml de água destilada, 4 g de paraformaldeído (dissolvido à temperatura de 95°C), 4 a 6 gotas de hidróxido de sódio 1 N, 5 g de dicromato de potássio e 5 a 9 gotas de dimetilsulfóxido (DMSO). Mergulhavam-se o CPF e a FH de cada animal num frasco de vidro escuro contendo 50 ml daquela solução e colocavam-se em estufa a 20°C. Eram posteriormente lavados numa solução de nitrato de prata a 0,75% e então transferidos para frascos idênticos contendo, cada um, aquela mesma quantidade de solução aquosa de nitrato de prata a 1,5% e de novo colocados em estufa àquela temperatura, durante mais 96 horas (96).

Terminada a impregnação, e após rápidas passagens por álcool absoluto e terpineol, os fragmentos eram parcialmente incluídos em bases de parafina que se orientavam apropriadamente ao serem colocados no suporte do micrótomo de deslizamento onde se realizavam cortes com espessura aproximada de 100 μm; os cortes do CPF eram coronais e os da FH perpendiculares ao eixo septotemporal.

Os diversos cortes, à medida que se obtinham, passavam por álcool absoluto e mergulhavam-se ordenadamente numa placa de Petri contendo terpineol. Finalmente, eram montados em lâminas, lavados com xilol e cobertos por uma camada de resina sintética (*Dammar*) e de xilol na proporção de 2 para 1, ou de *Caedax*.

---

* Não há uniformidade de critérios na definição de região hipocâmpica, formação do hipocampo e hipocampo (11,16,115). De acordo com Angevine (16) considerou-se a formação do hipocampo (FH) como o conjunto da área denteada, do hipocampo e do subículo (ver "Resultados").

2.2.Microscopia electrónica

O processamento do material para microscopia electrónica foi feito de acordo com a rotina praticada no Instituto de Anatomia, que pouco difere das técnicas descritas por Palay e Chan-Palay (211).

Os fragmentos do CPF e da FH eram lavados na solução tampão e submetidos a pós--fixação numa solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, na qual permaneciam 2 horas. Após uma passagem rápida por álcool a 50%, eram imersos durante 1 hora numa solução alcoólica a 70% de acetato de uranilo e em seguida desidratados através de passagens sucessivas por soluções alcoólicas de concentração crescente (70%,90%,95%) até ao álcool absoluto, no qual permaneciam durante 1 hora.

Terminada a desidratação, iniciava-se a penetração da resina nos fragmentos através de um primeiro banho, durante 30 minutos, numa mistura de resina epóxica (*TAAB*) e de óxido de propileno em partes iguais, para em seguida permanecerem, durante a noite, numa mistura idêntica mas em que a proporção de resina e de óxido de propileno era de 2 para 1. Finalmente, os fragmentos eram incluídos em resina epóxica (*TAAB*).

Os diversos passos descritos atrás eram executados à temperatura ambiente, com excepção para a polimerização da resina de inclusão que se realizou em estufa a 60°C durante, pelo menos, 24 horas.

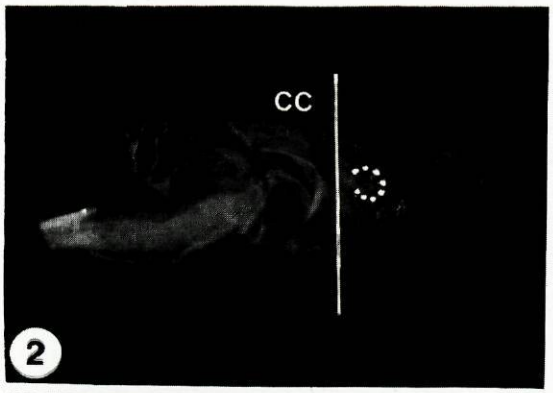
2.2.1. Dos fragmentos da FH, seleccionaram-se 3 pertencentes à porção média desta formação. Os cortes semifinos (2μm) foram obtidos paralelamente à superfície do corte do fragmento e corados pelo azul de toluidina (Fig.4A). Os cortes ultrafinos foram obtidos, tendo como referência os semifinos, no estrato lúcido (12,115), na sua porção justa-hilar, isto é, situada entre as extremidades das lâminas lateral e medial da camada granular; foram recolhidos em grelhas de malha de cobre revestidas por membrana de formvar e contrastados pelo acetato de uranilo e citrato de chumbo.

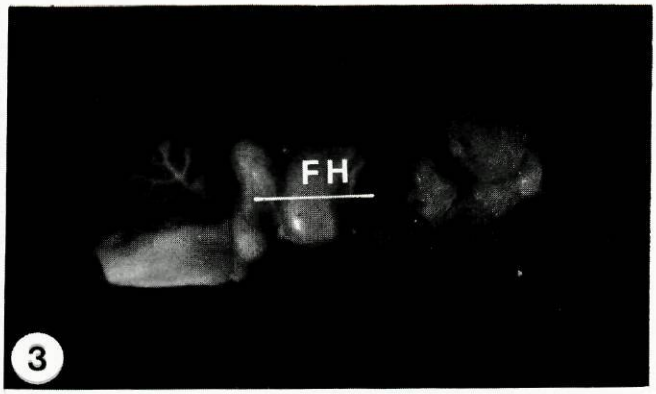
Fig. 2. Superfície medial do hemisfério cerebral esquerdo. Visualizam-se ainda o bolbo olfactivo, o tronco cerebral e o cerebelo, seccionados sagitalmente. A linha vertical, que passa um pouco atrás do joelho do corpo caloso (CC), corresponde ao local da secção coronal realizada neste trabalho para o isolamento da porção do hemisfério que contém a parte do córtex prefrontal estudada. A localização da área prelímbica encontra-se demarcada pelo pontuado. Rato de 14 meses. 2,5 X.

Fig. 3. Aspecto lateral da formação do hipocampo (FH) do hemisfério direito após remoção do neocórtex. A linha horizontal situa-se na porção mediotemporal. Rato de 14 meses. 3,5 X.

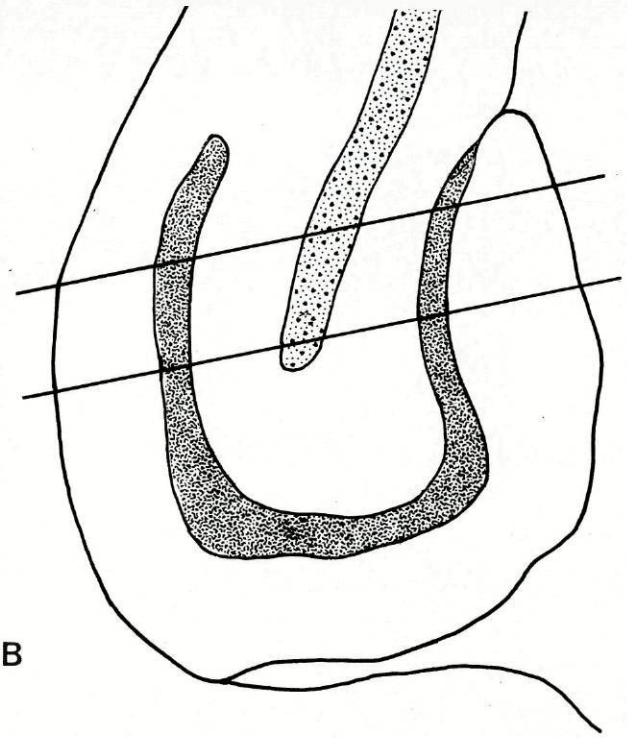
Fig. 4. A- Corte semifino da área denteada obtido na porção mediotemporal da formação do hipocampo; é visível a porção justa-hilar da camada piramidal (CA3). As setas indicam o local do estrato lúcido onde se colheu material para estudo ultrastrutural. As pontas de seta assinalam a porção da fissura do hipocampo obliterada. CM, camada molecular; CG, camada granular; H, hilo da fáscia denteada. 6 meses de alcoolização. Azul de toluidina. 50 X.
B- Desenho à câmara clara do mesmo corte. Os segmentos de recta paralelos interceptam os locais onde foram medidas as espessuras da área denteada, das camadas molecular e granular da fáscia denteada e da camada piramidal de CA3.

Fig. 5. A- Corte coronal do córtex prefrontal do hemisfério direito, obtido num vibratomo. Rato de 14 meses. 12,5 X.
B- Esquema do mesmo corte, no qual estão assinalados os limites das áreas do córtex prefrontal medial: PCm, precentral medial; CA, cingulada anterior; PL, prelímbica; IF, infralímbica. CC, corpo caloso (*forceps minor*); FR, fissura rinal.

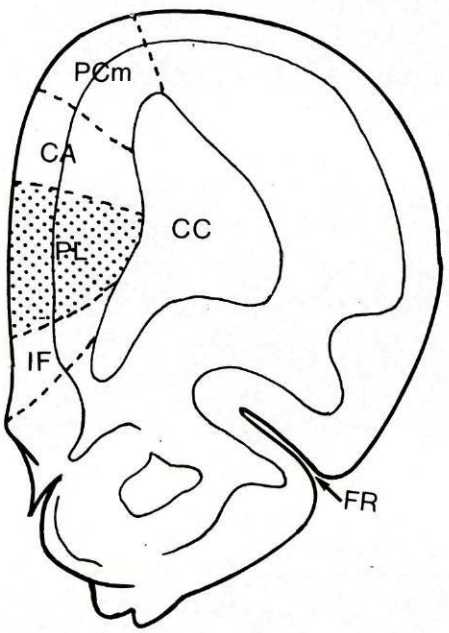

CC
2


FH
3


CA3
CM
CG


B


5A


PCm
CA
CC
PL
IF
FR
B

2.2.2. Dos fragmentos seriados obtidos por secções coronais do CPF, foram seleccionados os da parte intermédia, excluindo-se os das extremidades. Os estudos centraram-se na área prelímbica (PL) situada na parte rostral da superfície medial do hemisfério (Figs.2 e 5A,B). A demarcação desta área obedeceu aos critérios definidos por Krettek e Price (157), Vogt e Peters (336) e Van Eden e Uylings (321). Para tal, das referidas secções coronais do CPF individualizaram-se blocos de material seccionando-se aquelas segundo dois planos: um, perpendicular à parte média da superfície medial do fragmento; outro, perpendicular ao primeiro e partido da porção mais elevada da superfície dorsolateral. Os cortes semifinos foram obtidos perpendicularmente à superfície pial do bordo medial do fragmento. Os cortes semifinos (3μm) foram corados pelo azul de toluidina, para estudo em microscopia de luz, e os ultrafinos tratados como o descrito em 2.2.1..

3. ESTUDOS QUANTITATIVOS

3.1. Estudos quantitativos em cortes semifinos

3.1.1. Formação do hipocampo

3.1.1.1. Espessura das camadas corticais

A determinação da espessura da área denteada (AD), das camadas molecular e granular da fáscia denteada (FD) e da camada piramidal de CA3 do hipocampo na sua porção justa-hilar foi feita nos cortes semifinos já referidos (2.2.1.) que englobassem a totalidade da superfície da AD (Fig.4A).

Para cada animal utilizaram-se 3 fragmentos da região mediotemporal e de cada um obtiveram-se 4 grupos de 3 cortes consecutivos. Cada grupo encontrava-se separado do seguinte por, pelo menos, 12 μm.

Do conjunto dos 12 cortes correspondentes a cada fragmento desenharam-se esquematicamente, à câmara clara e com uma objectiva plana 4 X, os contornos da AD - limitada lateralmente pela fissura hipocâmpica obliterada que se identificou pela presença de vasos dispostos longitudinalmente (14) -, das camadas molecular (partes medial e lateral) e granular (lâminas medial e lateral) da FD e ainda da porção justa-hilar (sub-campo c) do campo CA3 do hipocampo (178), correspondentes ao primeiro, a um dos intermédios e ao último dos cortes (Fig.4B).

Nos desenhos obtidos a uma ampliação final de 68 X, traçaram-se duas linhas paralelas distanciadas entre si de 20 mm e perpendiculares ao bordo medial da lâmina medial da camada granular, a primeira das quais situada a 12-15 mm do vértice desta lâmina (Fig.4B).

Em cada esquema, o valor médio das duas medidas das porções correspondentes das linhas paralelas interceptadas pelos contornos previamente desenhados traduzia a espessura média de

a) área denteada (entre o bordo medial da camada molecular e a fissura do hipocampo obliterada);
b) porções lateral e medial da camada molecular da fáscia denteada;
c) lâminas lateral e medial da camada granular da fáscia denteada;
d) camada piramidal do campo CA3 do hipocampo na sua porção justa-hilar.

3.1.1.2. Densidade numérica das células granulares da fáscia denteada

A determinação do número de células granulares por unidade de volume da camada granular - densidade numérica (N_v) - foi feita utilizando os cortes semifinos já descritos no ponto anterior.

Em cada grupo de cortes seriados obtidos de 3 blocos diferentes por animal (2.2.1.) fotografaram-se em filme *Copex* (*Agfa*), com objectiva plana 20 X, áreas correspondentes do terço médio da lâmina lateral da camada granular de 2 cortes adjacentes. Os filmes foram sujeitos a inversão para tornar positivas as imagens fotografadas.

A densidade numérica destas células foi calculada pelo método do *disector* (41,77,280,357) a partir das imagens destes filmes projectadas pelo ampliador. As contagens foram efectuadas com a ampliação final de 680 X.

Este método do *disector* não depende do tamanho, forma, orientação, hiperprojecção e orientação do plano de secção das partículas a estudar (41,77,280); consiste em dois cortes paralelos, o corte de referência - *reference section* (41,77) - e o corte de pesquisa - *look up section* (41,77) - separados por uma distância conhecida. No primeiro corte assinalam-se com o sinal (-) e contam-se todas as partículas contidas numa área teste de uma grelha apropriada. No segundo somente as que desaparecem na mesma área do corte é que são consideradas e assinaladas com o sinal (+) (77). Neste caso consideraram-se como partículas os perfis nucleares das células granulares.

Utilizou-se uma folha rectangular de acetato transparente com dimensões um pouco maiores que os limites da imagem projectada pelo ampliador (18x12,3 cm) na qual estava inscrito um rectângulo de 15x5 cm, de lados equidistantes aos limites da folha transparente; este rectângulo foi dividido em três quadrados de 5 cm de lado que constituíam as áreas teste.

A contagem dos perfis nucleares foi feita de acordo com a regra da linha proibida de Gundersen (128), que exclui todas as partículas interceptadas pelos lados inferior e esquerdo de cada área teste; assim, em cada quadrado os perfis contados foram os totalmente nele contidos e ainda os interceptados pelos lados superior e direito.

Utilizou-se alternadamente cada um dos dois cortes de cada *disector* como corte de referência (41,357).

Para o cálculo do número de células por unidade de volume da lâmina lateral da camada granular da FD empregou-se a fórmula (77,280)

$$N_V = (p/a)\ h^{-1}\ M^2 \sum_{i=1}^{n} N_i^{(+)} \Big/ \sum_{j=1}^{n} P_J$$

na qual

p/a = inverso do valor da superfície de cada área teste,
h = distância que separa os cortes (altura do *disector*),
M = ampliação,
n = número de *disectores*,
$N_i^{(+)}$ = número total de perfis assinalados com (+) no *disector* i,
P_j = número de áreas teste utilizadas em cada *disector*.

No caso vertente

$p/a = 1/50^2\ mm^{-2}$,
$h = 0{,}002$ mm,
$M = 680$,
$P_j = 3$.

A espessura dos cortes, realizados todos no mesmo ultramicrótomo, foi considerada de 2 μm.

O cálculo da ampliação final das imagens projectadas pelo ampliador foi feito a partir da determinação da ampliação final duma parcela do retículo duma lâmina micrométrica fotografada e ampliada nas mesmas circunstâncias que os cortes.

De cada bloco utilizaram-se 3 ou 4 pares de cortes o que se traduziu em 18 ou 24 *disectores* por animal.

3.1.1.3. Densidade numérica das células piramidais de CA3

A determinação da densidade numérica das células piramidais do campo CA3 foi igualmente feita em imagens de filme *Copex* sujeito a inversão; os cortes semifinos utilizados foram os empregues para a determinação do número relativo de células granulares da FD, mas agora fotografados com uma objectiva plana 10 X.

As fotografias das áreas correspondentes dos 2 cortes adjacentes foram feitas na porção justa-hilar do campo CA3, isto é, em CA3c.

Empregou-se novamente o método do *disector* (41,77,280), utilizando a mesma área teste e os mesmos critérios de contagem dos perfis nucleares utilizados na determinação do N_v das células granulares.

Aplicou-se a fórmula já referida (3.1.1.2.) mas a ampliação final passou a ser de 340 X.

As determinações foram feitas em 3 blocos por animal e do mesmo modo que em 3.1.1.2.. Assim, o número médio de *disectores* por animal foi de 18 a 24.

3.1.2. Córtex prelímbico

3.1.2.1. Espessura das camadas corticais I-III

A determinação da espessura das camadas I-III do córtex da área PL foi feita a partir de cortes semifinos obtidos de 2 blocos de cada animal. De cada bloco obtiveram-se 4 grupos de 3 cortes consecutivos com a espessura de 3 μm. Cada grupo encontrava-se separado do seguinte por, pelo menos, 9 μm.

Desenharam-se à câmara clara, com uma objectiva plana 10 X, os contornos do primeiro, de um dos intermédios e do último dos cortes do conjunto de 12 obtidos de cada bloco, assinalando-se no esboço os limites entre as diferentes camadas. Nos esboços, com uma ampliação final de 180 X, traçaram-se 3 linhas paralelas entre si e perpendiculares à superfície pial do córtex, uma em cada um dos bordos laterais do desenho e a terceira a meia distância entre eles. Nelas se mediram as distâncias entre a superfície pial e o limite profundo da camada

III e calculou-se a média dos valores encontrados nos 6 cortes semifinos estudados em cada animal; seguidamente, foi calculado o valor médio da espessura por grupo de animais.

3.1.2.2. Densidade numérica das células piramidais da camada III

A determinação do número de células piramidais da camada III do córtex PL foi feita nos cortes semifinos corados pelo azul de toluidina (3.1.2.1.).

Por cada um dos 2 blocos por animal fotografaram-se, com uma objectiva plana 10 X, áreas correspondentes da camada III em 2 ou 3 cortes adjacentes de cada um dos 4 grupos de cortes consecutivos. Tal como para o cálculo do N_v das células granulares da FD, a determinação do número de células piramidais por unidade de volume da camada III do córtex PL foi efectuada utilizando o *disector* (41,77,280).

As determinações foram realizadas em fotografias com ampliação final de 340 X.

Consideraram-se como partículas os perfis nucleares e utilizaram-se imagens de cortes adjacentes (1º e 2º ou 2º e 3º) ou alternados (1º e 3º) de cada um dos grupos de 3 cortes consecutivos.

Utilizou-se uma folha rectangular de acetato transparente, com dimensões apropriadas à fotografia, e cujos limites se faziam coincidir com os da área fotografada do corte . Esta folha foi dividida por uma quadrícula obtida pelo traçado de um conjunto de linhas paralelas e distanciadas de 24 mm sobre as quais, e perpendicularmente, se traçou idêntico conjunto de linhas. Umas e outras estabeleciam ângulos de 45° com os lados do rectângulo. Como resultado deste traçado obteve-se uma grelha constituída por 24 quadrados de 24 mm de lado. As contagens foram realizadas em metade destes (áreas teste) seguindo os critérios de Gundersen (128); igualmente se utilizou alternadamente cada um dos cortes como corte de referência (41,357).

O valor do N_v foi calculado pela fórmula já referida, mas neste caso $p/a = 1{,}24^2$ mm^{-2}, M = 340, h = 0,003 ou 0,006 mm conforme se utilizaram cortes adjacentes ou alternados, respectivamente, e $P_j = 12$. O cálculo da ampliação final das fotografias foi efectuado do mesmo modo que o referido em 3.1.1.2..

De cada bloco utilizaram-se 3 ou 4 pares de cortes o que se traduziu em 12 a 16 *disectores* por animal.

3.2. Estudos quantitativos com o método de Golgi

3.2.1. Células granulares da fáscia denteada

3.2.1.1. Geometria das árvores dendríticas. Análises métrica e topológica

A análise métrica e topológica das arborizações dendríticas das células granulares da FD foi feita nos cortes de material impregnado pelo método de Golgi-Stensaas modificado, conforme atrás se referiu (2.1.). Foram estudados os grupos alcoolizados durante 6 e 18 meses e respectivos controlos e o grupo de abstinência 2. Razões de duas ordens levaram à exclusão dos grupos de animais alcoolizados durante 12 meses e respectivos controlos e do grupo de abstinência 1: nos dois primeiros, o material impregnado pela prata não apresentava, por animal, número suficiente de células que permitisse análise tridimensional sólida (310,311); por outro lado, não se estudaram os animais do grupo de abstinência 1 pois, pelas razões atrás refe-

ridas, não se dispunha, para fins comparativos, de grupo de controlo com a mesma idade.

Em cada animal, as células foram seleccionadas ao acaso em ambas as lâminas medial e lateral da camada granular e englobadas num único grupo. Desprezaram-se as células situadas na crista denteada ou próximo dela pois o padrão das arborizações dendríticas destas células é consideravelmente diferente do das restantes (48,125,278).

Estudaram-se as células granulares de 12 animais nos grupos de 6 meses (6 alcoolizados e 6 controlos), de 4 animais em cada um dos grupos de 18 meses - os restantes 2 animais de cada grupo não possuíam número suficiente de células impregnadas que preenchessem a totalidade dos critérios estabelecidos como fundamentais (83,84,310,311) - e ainda 5 animais do grupo de abstinência 2.

O número de células, por animal, cujas árvores dendríticas foram analisadas variou entre 10 e 15 e seleccionaram-se de acordo com critérios definidos por vários autores (83,84,125,360), salientando-se: (1) localização do pericário nos dois terços profundos da camada granular; (2) boa qualidade de impregnação celular (que permitisse reconhecer o segmento inicial do axónio); (3) arborizações dendríticas não obscurecidas por dendritos de outras células, por glia e por vasos sanguíneos impregnados ou ainda contaminadas por depósitos argênticos.

3.2.1.1.1. Análise métrica

O estudo tridimensional foi realizado com um sistema semi-automático de medição dendrítica concebido e instalado no *Netherlands Institute for Brain Research*, em Amsterdam (210,311). Este sistema é basicamente constituído por um microscópio de platina móvel ligado a um computador que regista todos os movimentos desta. Por meio de comandos apropriados accionam-se três motores que fazem a platina deslocar-se à medida que se observa directamente o neurónio através do microscópio. Por registo digital, pelo operador, de pontos determinados - como o centro do corpo celular, a origem dos prolongamentos que deste emergem e os pontos de bifurcação, terminação e deflecção de cada um destes prolongamentos individualmente (210) - é possível medir as arborizações dendríticas usando as três coordenadas cartesianas (x,y,z). O mesmo painel de comandos digitais proporciona ainda, e sempre que necessário, o regresso automático da platina à posição anterior ou ao centro do corpo celular. Utilizou-se uma objectiva 40 X o que implicou correcção posterior dos valores obtidos para z, a única coordenada dependente da espessura do corte, já que o programa utilizado estava preparado para registar as medidas das coordenadas corrigidas para a utilização de objectiva de imersão (311). O uso daquela objectiva de 40 X foi condicionado pelo facto de os cortes serem cobertos por camada espessa de resina, sem lamelas, o que impossibilitou o emprego da objectiva de imersão.

Os parâmetros analisados em cada célula foram os seguintes (83,310,311):

a) área projectada do corpo celular;
b) número total de dendritos;
c) número total de segmentos dendríticos;
d) comprimento dendrítico total;
e) comprimento individual dos segmentos;
f) distância radial.

Os diversos segmentos dendríticos foram individualizados nos seguintes tipos:

a) segmentos terminais;
b) segmentos intermediários;
c) segmentos cortados.

A distinção entre segmentos terminais e segmentos cortados obedeceu aos critérios definidos por Caceres e Steward (48), dos quais se salientam o modo de terminação dos segundos e a localização dos seus pontos terminais em relação ao limite da área onde se distribuem esses dendritos.

Discriminou-se ainda, em cada célula, o comprimento de cada um dos tipos de segmentos quer intermediários quer terminais e, ainda, os primeiros conforme o seu grau (311) (Fig.6A) e os segundos de acordo com a sua ordem (310-312). A Figura 6, baseada na proposta de Uylings e col. (83,311), mostra a correspondência entre a classificação dos segmentos segundo o seu tipo e o seu grau, considerando este último como sendo o número de extremidades terminais periféricas a um dado segmento (311). Verifica-se, pela análise da Figura 6A, que os segmentos de grau = 1 são os segmentos terminais (t), os de grau = 2 são os segmentos intermediários que dão origem a 2 segmentos terminais (itt), os de grau = 3 correspondem aos segmentos intermediários que se ramificam num terminal e num intermediário (iit) e os de grau ≥ 4 podem ser também do tipo iit ou então segmentos intermediários que se bifurcam em outros dois segmentos intermediários (iii) (83,311).

O sistema de ordenação dos segmentos dendríticos que se adoptou foi o centrífugo (311,312), no qual os segmentos surgidos do corpo celular são considerados de ordem zero e os que sucessivamente surgem após cada bifurcação são acrescidos de uma unidade no seu número de ordem (311,312,) (Fig.6B).

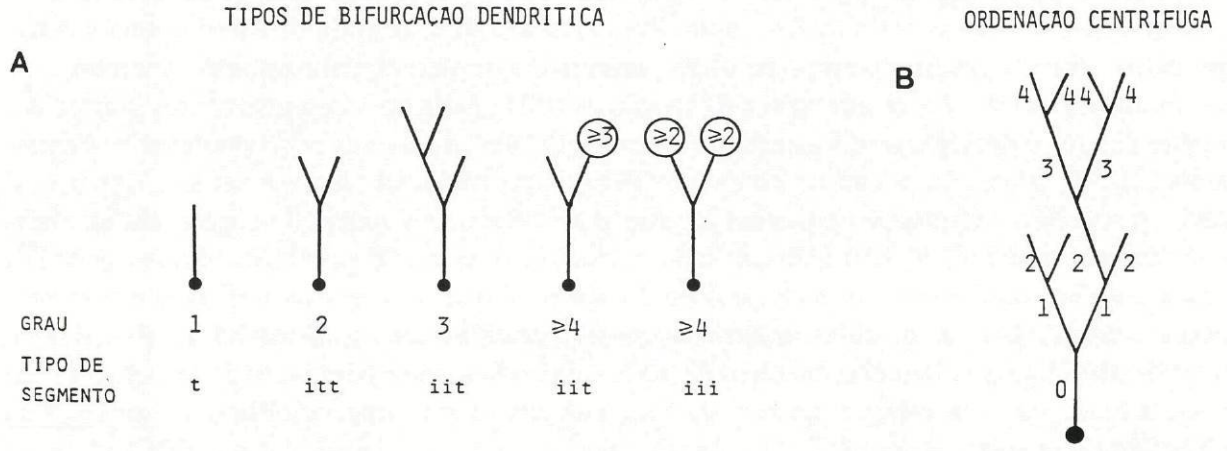


Fig. 6. Representação esquemática da classificação dos segmentos de acordo com os tipos de bifurcação dendrítica (A) e do sistema de ordenação centrífuga (B) aplicado às arborizações dendríticas (baseada em 83).

Em cada célula determinou-se a distância radial que corresponde à distância entre o centro do corpo celular e a extremidade dos segmentos terminais (310).

Nas células utilizadas na análise tridimensional fez-se a contagem do número de espinhas dendríticas.

Estas contagens foram realizadas com o auxílio de uma câmara clara ao longo de 20 µm de comprimento dendrítico, usando uma objectiva plana 40 X (ampliação final de 720 X).

Foram feitas separadamente nos ramos dendríticos situados nos terços interno e externo da camada molecular de células pertencentes às lâminas medial e lateral da camada granular.

A escolha das porções dos dendritos para a realização das contagens baseou-se nos seguintes critérios propostos por Desmond e Levy (85) e De Ruiter e Uylings (83): (1) boa impregnação dos dendritos; (2) segmentos dendríticos relativamente rectilinizados; (3) ramos dendríticos no plano de foco numa extensão de pelo menos 20 μm; (4) não inclusão de porções de segmentos dendríticos adjacentes a pontos de ramificação.

Foram estudadas em média 15 células por animal e em cada célula escolhidos 2 dendritos para a contagem no terço interno e 5 (segmentos terminais) no terço externo da camada molecular.

Não se discriminaram as três categorias de espinhas descritas para as células granulares por Desmond e Levy (85).

Os resultados das contagens foram expressos sem qualquer correcção (102) em número de espinhas por 20 μm de ramo dendrítico e por célula, considerando separadamente as quantificadas nos dendritos do terço interno e nos do terço externo da camada molecular.

3.2.1.1.2. Análise topológica

O sistema semi-automático computorizado utilizado na análise métrica das árvores dendríticas possibilitou ainda, relativamente a cada célula medida, a análise topológica do padrão da sua ramificação dendrítica através da decomposição de cada árvore nas suas diferentes partições (330).

Assim, a sequência de pontos identificados e registados nas arborizações dendríticas de cada célula como locais de bifurcação e pontos de terminação de ramos era transferida directamente do sistema semi-automático de medição para o computador. A partir das sequências obtidas, cada árvore dendrítica era decomposta nas suas partições (330) que subsequentemente eram analisadas segundo os métodos descritos por Van Pelt e Verwer (324-326) e Verwer e Van Pelt (330). Para esta decomposição considerou-se que cada ponto de bifurcação de um ramo dendrítico origina duas árvores filhas e assim o número de segmentos terminais, que define o grau da árvore, fica "partido" na sua primeira bifurcação. Define-se, assim, partição como o par de valores correspondentes ao número de segmentos terminais (grau) das duas árvores filhas originadas de uma bifurcação (325,330). Cada ponto de bifurcação é pois caracterizado pela sua partição n (r,s) em que n representa o número total de segmentos terminais e r e s o número de segmentos terminais nas duas árvores filhas.

Após a decomposição das arborizações dendríticas calcularam-se as frequências das respectivas partições (330) pela contagem dos segmentos terminais pertencentes às duas árvores filhas de cada bifurcação, obtendo-se depois o somatório, para cada partição, de todas as árvores analisadas em cada grupo. Como obervações individuais, só se consideraram relevantes as partições de grau ≥ 4 (324).

As distribuições de frequência observadas foram comparadas com modelos definidos para um (330) ou para dois parâmetros (324-327). No primeiro caso, o parâmetro considerado e denominado Q, relaciona entre si as probabilidades de ramificação dos segmentos intermediários (pi) e as dos terminais (pt) sendo $Q = pi/(pi+pt)$ (326). O modelo terminal (T), no qual somente os segmentos terminais apresentam maior probabilidade de originar novos ramos, é explicado para valores de $0<Q<0,5$ e o modelo segmentar (S), no qual todos os segmentos apresentam a mesma probabilidade de se ramificar, para valores de $0,5<Q<1$.

No caso do modelo para dois parâmetros incorpora-se, para além do parâmetro Q, um outro denominado S, que rege a dependência da ordem dos ramos (326,327). Assim, a probabilidade de ramificação de um segmento depende não só do seu tipo, intermediário ou terminal, mas também da sua ordem, isto é, da distância topológica desse segmento à raíz da árvore (326,327). Esta dependência é incorporada numa relação exponencial modulada pelo parâmetro S de tal modo que, se S>0, a probabilidade de ramificação dos segmentos proximais é superior à dos segmentos distais; para S<0, a probabilidade de ramificação dos segmentos distais é maior do que a dos proximais; para S=0, todos os segmentos do mesmo tipo têm igual probabilidade de ramificação (326,327).

Para o processamento subsequente dos dados referentes às partições lançou-se mão de programas computorizados existentes no *Netherlands Institute for Brain Research* (325--327,330). A opção do programa executa o ajuste da máxima verosimilhança (MLL - -*Maximum Likelihood*) para uma amostra de partições, variando a probabilidade relativa da ramificação dos segmentos intermediários e terminais e a dependência da ordem dos segmentos. A procura do valor máximo no terreno da função de verosimilhança (LL- -*Likelihood*) é executada por passos ortogonais no espaço adstrito aos dois parâmetros (Q e S). Cada vez que um valor máximo é encontrado, a dimensão dos passos de procura é reduzida e é procurado novo valor máximo. O programa fornece as probabilidades das partições calculadas com a melhor aproximação para os parâmetros Q e S (327).

No total foram estudadas 330 células, assim distribuídas por grupo de animais: 174 nos grupos de 6 meses (87 nos alcoolizados e 87 nos controlos), 85 nos grupos de 18 meses (41 nos alcoolizados e 44 nos controlos) e 71 no grupo de abstinência 2.

3.2.2. Células piramidais da camada III do córtex prelímbico

3.2.2.1. Geometria das árvores dendríticas. Análises métrica e topológica

A análise tridimensional das arborizações dendríticas das células piramidais da camada III do córtex PL cingiu-se, tal como na FD, aos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses e respectivos controlos e ao grupo de abstinência 2. As razões que levaram à exclusão dos restantes 3 grupos de animais que completam o material desta experimentação foram já indicadas (3.2.1.1.).

Além disso, restringiu-se este estudo quantitativo às arborizações dendríticas basais já que os dendritos apicais, na grande maioria dos neurónios impregnados, não obedeciam aos critérios estabelecidos como fundamentais (83,84,310) para o seu estudo, visto apresentarem-se frequentemente cortados ou então difíceis de identificar com segurança pois as suas arborizações não se individualizavam das árvores dendríticas vizinhas.

Estudaram-se as arborizações dendríticas basais das células piramidais de 11 animais dos grupos de 6 meses (5 alcoolizados e 6 controlos), 9 dos grupos de 18 meses (5 alcoolizados e 4 controlos) e ainda 5 animais do grupo de abstinência 2.

O número de células, por animal, cujas árvores dendríticas basais foram analisadas, variou entre 10 e 20 e seleccionaram-se segundo critérios já enunciados a propósito da selecção das células granulares (83,84) excepto, como é óbvio, no respeitante à localização do soma que, neste caso, era em plena camada III.

3.2.2.1.1. Análise métrica

O sistema de medição dendrítica e a objectiva utilizada, bem como os parâmetros analisados, a distinção entre os diferentes tipos de segmentos e o sistema da sua ordenação, foram já referidos em 3.2.1.1.1..

As espinhas dos dendritos basais das pirâmides da camada III do córtex PL foram contadas em células utilizadas na análise métrica.

Ainda aqui, e pelas razões já apontadas, circunscreveram-se as contagens aos dendritos basais das células piramidais dos animais dos grupos de 6 e 18 meses e do grupo de abstinência 2.

As espinhas foram contadas do mesmo modo e seleccionadas segundo os mesmos critérios que as dos dendritos das células granulares da FD. Em cada uma das 10 a 15 células estudadas por animal, foram seleccionados para esta análise 5 segmentos intermediários, independentemente da sua ordem, e 5 segmentos terminais.

Nestas contagens não se discriminaram as três variedades morfológicas de espinhas descritas por Peters e Kaiserman-Abramof (231) nas células piramidais das camadas II e III do córtex parietal do Rato.

Os resultados das contagens foram expressos sem qualquer correcção (102) em número por 20 μm de ramo dendrítico e por célula, distinguindo-se os segmentos intermediários dos segmentos terminais.

3.2.2.1.2. Análise topológica

No respeitante à análise topológica do padrão de ramificação dendrítica das células piramidais procedeu-se conforme o já descrito (3.2.1.1.2.).

No total, foram analisadas 380 células, assim distribuídas por grupos de animais: 142 nos de 6 meses (69 nos alcoolizados e 73 nos controlos), 160 nos grupos de 18 meses (77 nos alcoolizados e 83 nos controlos) e 78 no grupo de abstinência 2.

3.3. Estudos quantitativos ultrastruturais

3.3.1. Formação do hipocampo

3.3.1.1. Neurópilo do estrato lúcido

No neurópilo do estrato lúcido da FH analisaram-se as sinapses entre as FM e as células piramidais de CA3 e a fracção volumétrica dos TFM. O estudo foi feito em cortes ultrafinos obtidos em 3 blocos por animal. Por cada bloco foram feitos 3 conjuntos de 6 a 10 cortes seriados no estrato lúcido (12,34,57), referenciado em cortes semifinos previamente realizados.

3.3.1.1.1. Sinapses entre as fibras musgosas e as células piramidais de CA3

Para o cálculo do número de contactos sinápticos entre os TFM e as excrescências

dendríticas das células piramidais de CA3 (34) por unidade de volume de estrato lúcido, usou-se o método do *disector* (41,51,280) já referido.

Para tal, em cada um dos 3 conjuntos de cortes seriados por bloco foram fotografadas, a ampliação primária de 6.000 X, áreas correspondentes que possuíssem perfis de TFM e não incluíssem perfis dendríticos volumosos, muito abundantes nesta área.

Utilizou-se uma grelha rectangular em folha de acetato transparente em que estava inscrito um rectângulo de lados equidistantes aos do acetato, medindo 18x12 cm e dividido em 6 quadrados de 6 cm de lado (áreas teste).

Consideraram-se unicamente as sinapses entre os TFM e as espinhas das excrescências dendríticas que eram sinapses assimétricas (65,123). Em muitos dos contactos os perfis pós-sinápticos eram encurvados e às vezes mostravam duas ou mais zonas de densidades pós-sinápticas. No entanto, sempre que estas correspondiam a um único terminal eram consideradas como uma única junção sináptica.

Na contagem dos perfis, feita após a sobreposição da grelha em cada fotografia obtida a ampliação final de 18.000 X, seguiu-se a regra de Gundersen (128). Utilizaram-se conjuntos de 2 cortes adjacentes, cada um usado alternadamente como corte de referência (41,357) e aplicou-se a fórmula já referida (41,77,280).

Para a determinação da espessura dos cortes ultrafinos, aplicou-se o método de prega mínima proposto por Small (51,116,272). Consiste na utilização das chamadas pregas mínimas - pregas geralmente em forma de Y - que têm uma largura que corresponde ao dobro da espessura do corte. Para este cálculo fotografaram-se, a ampliação primária de 12.000 X, um total de 200 pregas seleccionadas ao acaso em diferentes cortes ultrafinos obtidos nos diferentes animais. As avaliações foram efectuadas em fotografias com ampliação final de 36.000 X, medindo-se a espessura da prega num local imediatamente antes da sua bifurcação. O valor médio desta espessura, utilizado como altura do *disector*, foi de 65 nm.

Por cada bloco foi feita uma média de 10 a 12 *disectores* o que equivale a 30 a 36 por animal.

A determinação da fracção de membrana dos TFM ocupada pelas junções sinápticas (12) foi feita nas mesmas fotografias (18.000 X) utilizadas para o cálculo do N_v das sinapses.

Seleccionou-se 1 das 6 a 10 fotografias de cada um dos 3 conjuntos relativos a cada bloco e marcou-se a tinta o contorno de todos os terminais presentes, excepto as zonas ocupadas por contactos sinápticos. Com o MOP Videoplan mediram-se, nas 9 fotografias por animal, não só a extensão da membrana de todos os terminais como também o comprimento das densidades pós-sinápticas. Calculou-se depois, por animal, o quociente entre o comprimento total destas densidades e o comprimento total das membranas medidas (12); os resultados foram expressos em percentagem.

3.3.1.1.2. Fracção volumétrica dos terminais das fibras musgosas

A determinação da fracção volumétrica (V_v) (351) ocupada pelos TFM no neurópilo do estrato lúcido foi feita, em cada animal, nas mesmas 9 fotografias utilizadas para o cálculo da fracção de membrana destes terminais ocupada por zonas activas, aplicando a metodologia morfométrica de Weibel (351).

3.3.2. Córtex prelímbico

3.3.2.1. Neurópilo da camada III

No neurópilo da camada III do córtex PL analisaram-se as suas sinapses e as fracções volumétricas (V_v) dos terminais nervosos e dos prolongamentos gliais.

Utilizaram-se cortes ultrafinos de 2 blocos por animal, e em cada bloco duas áreas separadas por dois cortes semifinos de 3 μm. Foram fotografados com ampliação primária de 8.000 X e estudados a ampliação final de 24.000 X. Fizeram-se 12 fotografias por animal (6 por bloco), ao acaso, evitando-se unicamente que o campo a fotografar apresentasse grandes áreas ocupadas por perfis dendríticos de grandes dimensões ou por corpos celulares.

3.3.2.1.1. Densidade numérica das sinapses axodendríticas e axospinhosas

Em cada fotografia marcaram-se a tinta os limites de todos os perfis dos contactos sinápticos axodendríticos e axospinhosos, seguindo-se critérios adiantados por outros autores (51,86,93) para a identificação de tais estruturas; discriminaram-se nestes perfis os contactos sinápticos perfurados e não perfurados (50,58,81,202,230), conforme apresentavam ou não soluções de continuidade nas densidades paramembranosas e respectivas membranas (50).

Com o auxílio de um MOP AMO1 mediu-se o comprimento do espessamento pós-sináptico de cada perfil e calculou-se depois, para cada animal, a média dos valores encontrados. No caso dos perfis perfurados o comprimento considerado correspondia a toda a extensão do contacto sináptico.

Para o cálculo do N_A (número por unidade de superfície) dos perfis sinápticos, houve que previamente calcular a área total do neurópilo estudada em cada animal. Tendo em linha de conta as dimensões e a ampliação final (24.000 X) das fotografias obtidas, determinou-se a área real de neurópilo fotografada em cada animal (815,1 μm^2) onde se contaram os perfis sinápticos.

Para o cálculo do número de sinapses por unidade de volume de neurópilo - densidade numérica (N_v) - recorreu-se a um método discreto de desdobramento (351) computorizado, aplicado a partir dos valores dos comprimentos dos espessamentos pós-sinápticos. Utilizou-se um programa existente no *Netherlands Institute for Brain Research* que tem em conta a divisão em classes e a distribuição por frequências propostas por Goldsmith (120), Cruz-Orive (75) e Weibel (351) e ainda as correcções para os perfis perdidos definidas por Bach (17). Trata-se da transformação de uma distribuição de frequências de perfis de objectos (densidades pós-sinápticas) - f(i) - numa outra de frequência de objectos (sinapses) - f(j) - desde que seja conhecida, ou considerada provável, uma forma apropriada para estes; neste caso, e de acordo com diferentes autores (82,86,198,329), consideraram-se os contactos sinápticos em forma de disco.

Para a obtenção do N_v das sinapses o programa aplica a fórmula de Abercrombie (1), para o que se tornou necessário incluir ainda a espessura dos cortes ultrafinos considerada de 70 nm, depois de calculada pelo método da prega mínima já descrito (272).

O método discreto de desdobramento facultou ainda o estudo de outros parâmetros quantitativos das sinapses como os valores do diâmetro médio e da área média dos discos sinápticos.

O cálculo dos valores dos parâmetros atrás referidos foi feito por animal e a média dos valores dos animais pertencentes a cada grupo foi ulteriormente calculada.

3.3.2.1.2. Fracções volumétricas dos terminais nervosos e dos prolongamentos gliais

A determinação das fracções volumétricas (351) ocupadas pelos terminais nervosos e pelos prolongamentos gliais no neurópilo da camada III do córtex PL foi feita, em cada animal, nas mesmas 12 fotografias utilizadas para o estudo das sinapses.

Em cada fotografia marcaram-se com tinta de cores diferentes os contornos dos perfis dos prolongamentos gliais e dos terminais nervosos, identificados segundo as descrições de outros autores (235).

Com o auxílio do MOP Videoplan mediu-se a área total ocupada pelos perfis dos terminais em cada animal, procedendo-se de igual modo em relação à glia.

Considerando a área média de neurópilo analisada por animal (815,1 μm^2) calcularam-se os V_vs dos terminais e da glia, por grupos de animais.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Todos os resultados quantitativos foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão dos valores médios dos animais de cada grupo (41). Esta representação deveu-se ao facto de ser maior a variação inter-animal dos parâmetros quantitativos estudados do que a variação intra-animal da mesma variável (41).

Aos grupos de animais alcoolizados e respectivos controlos aplicou-se uma análise de variância (ANOVA) para dois factores, o álcool e o tempo de experiência, analisando-se a interacção entre estes. Esta análise foi efectuada utilizando o programa *Statistical Package Statgraphics (SPSC, Inc.)*.

Para a comparação dos resultados obtidos nos grupos de animais alcoolizados, abstinentes e controlos da mesma idade aplicou-se o teste U não paramétrico de Mann-Whitney (69). Os grupos de animais abstinentes foram comparados com os alcoolizados e os controlos da mesma idade e ainda com os grupos que receberam álcool por igual período de tempo, utilizando a mesma estatística não paramétrica.

As diferenças entre os resultados dos diferentes grupos consideraram-se significativas sempre que o valor de p fosse menor que 0,05.

RESULTADOS

1. ANIMAIS E DIETAS

Com 8 semanas de idade, ocasião em que se iniciou a experimentação, o peso corporal médio dos 48 animais estudados era de 212 ± 14,5 g. Decorrido o primeiro mês, os animais dos grupos de controlo mostravam um aumento ponderal médio superior ao verificado nos animais alcoolizados. A partir do segundo mês de experiência, o peso corporal dos animais dos grupos testemunha sofreu aumento de 12,4 ± 1,8 g/mês e o dos alcoolizados de 10,7 ± 3,9 g/mês. Contudo, no fim de cada período experimental as diferenças de peso entre os animais alcoolizados e os controlos da mesma idade não eram significativas.

Em relação aos grupos de abstinência, verificou-se que a partir da retirada do álcool os 12 animais estudados mostravam um aumento ponderal médio de 9,9 ± 2,6 g/mês e que no dia do sacrifício os seus pesos corporais eram em média inferiores aos dos animais dos grupos controlo e alcoolizado da mesma idade. No entanto, esta diminuição não era estatisticamente significativa.

Nos grupos de abstinência verificou-se uma mortalidade de 25% que ocorreu nos primeiros 45 dias após o início da retirada do etanol, apesar da redução da sua concentração no líquido de bebida ter sido gradual durante as 2 primeiras semanas.

A quantidade média de álcool ingerido pelo conjunto dos animais submetidos a alcoolização durante os diferentes períodos experimentais foi de 8,6 ± 1,7 g/Kg de peso/dia. No decurso do 1º e do 18º meses de experiência verificou-se uma redução na quantidade de etanol ingerido, mais acentuada durante os primeiros 30 dias; no entanto, estas reduções de consumo não eram significativas em relação àquele valor médio. No cálculo desta quantidade média de álcool não se entrou em linha de conta com o etanol ainda ingerido durante as 2 primeiras semanas pelos animais dos grupos que iniciavam o período de abstinência.

Os pesos médios dos cérebros dos animais dos diferentes grupos eram de 1,649 ± 0,07 g para os grupos controlo e de 1,634 ± 0,06 g para os alcoolizados. No grupo de abstinência 1 o valor médio encontrado era de 1,633 ± 0,09 g e no de abstinência 2 de 1,629 ± 0,05 g. Estas diferenças não eram estatisticamente significativas quando se comparavam quer os grupos alcoolizados com os controlos da mesma idade quer cada grupo de abstinência com o controlo e o alcoolizado da mesma idade e com o que ingeriu álcool etílico durante o mesmo período de tempo.

2. FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO

2.1. Observações qualitativas

2.1.1. Microscopia de luz

2.1.1.1. Cortes semifinos

A observação em microscopia de luz dos cortes semifinos da porção mediotemporal da formação do hipocampo (FH) dos animais estudados mostrou uma organização estrutural em tudo idêntica à descrita por vários autores (16,32,115,163,178,268,358).

Assim, a área denteada (AD), ou circunvolução denteada (Fig.4A), de acordo com Blackstad (32) e outros autores (11,16,115) compreendia a fáscia denteada (FD) e o hilo da fáscia denteada; por sua vez, a FD era composta pela camada molecular e pela camada granular, esta situada entre aquela e o hilo. No conjunto, a AD ocupava a porção da FH localizada entre a superfície pial da camada molecular e a fissura do hipocampo obliterada (Fig.4A).

Nos cortes da porção mediotemporal da FH seleccionada para este estudo, a FD apresentava configuração em forma de U de abertura voltada para a fímbria do fórnice (114,115,175,358). O campo CA4 do hipocampo (178) encontrava-se integrado no hilo da FD onde se visualizavam neurónios de configuração variada e diferentemente orientados que constituem a camada polimórfica.

A camada granular, de limites facilmente identificáveis, mostrava as suas lâminas lateral ou suprapiramidal e medial ou infrapiramidal que se uniam posteriormente na crista denteada (114). As células granulares apresentavam distribuição e aspecto coincidentes com os descritos por outros autores (112,163,178,268): dispostas em 6 ou 7 camadas compactas (161), possuíam escasso citoplasma e núcleos arredondados ou esféricos muito discretamente corados. Por entre estes grânulos eram facilmente observados perfis de dendritos de dimensões variáveis que se dirigiam para a camada molecular.

A camada molecular era perifericamente limitada pela superfície pial medialmente (porção medial da camada) e pela fissura do hipocampo obliterada (porção lateral da camada) que a separava posteriormente do subículo e lateralmente do campo CA1. Nesta camada observaram-se perfis dos dendritos das células granulares que se apresentavam formando malha extremamente densa.

O hipocampo ou corno de Ammon (16,32,115,178,244) era formado por camada bem definida de células piramidais cujos diferentes aspecto e disposição levaram Ramón y Cajal (244) a dividi-lo em região superior e região inferior e mais tarde Lorente de Nó (178) a atribuir-lhe a denominação de campos CA1, correspondente à região superior, e CA2, CA3 e CA4 englobados na região inferior; de acordo com Amaral (11) e Blackstad (32), considerou-se o campo CA4 parte integrante do hilo da FD.

Nos cortes estudados, a camada piramidal mostrava arranjos citoarquitectónicos com características diferentes conforme a região, de acordo com as descrições de Lorente de Nó (178) e de outros autores (115,163). O campo CA1, adjacente ao subículo, era formado por banda estreita de células piramidais de pequenas dimensões e densamente agrupadas (115,178). O campo CA2, que Lorente de Nó (178) descreveu como formado por células piramidais de dimensões e aspecto semelhantes às de CA1 e por outras com características idênticas às de CA3, correspondia, nos cortes observados, a uma porção da camada piramidal de

reduzidíssima extensão em relação à dos campos CA1 e CA3; era um pouco mais larga que nestas regiões e formada por células de dimensões variáveis e densamente agrupadas. A camada piramidal de CA3 era constituída por células piramidais maiores e agrupadas em paliçada de forma menos compacta que em CA1.

Em muitas das células piramidais dos campos referidos os núcleos apresentavam nucléolo bem visível. No citoplasma de grande parte delas era ainda visível a presença de grânulos de lipofuscina e vacúolos provavelmente correspondentes a corpos multivesiculares gigantes, a maioria das vezes situados na base do dendrito apical e mais abundantes nos animais mais velhos, sobretudo nos alcoolizados (36,221).

Em muitas células era visualizável a emergência do dendrito apical que se orientava em direcção à fissura do hipocampo; por sua vez, os dendritos basais dispunham-se em direcção oposta à anterior. As arborizações dendríticas, apical e basal, estendiam-se pelas camadas radiada e *oriens*, respectivamente.

O subículo não foi estudado no presente trabalho.

A observação qualitativa da camada granular da FD (Fig. 7 A,B) e da camada piramidal de CA3 (Fig.8 A,B) mostrou que a densidade das células era menor em todos os animais que foram sujeitos a alcoolização, seguida ou não de abstinência (Figs. 7B, 8B).

2.1.1.2. Método de Golgi

O estudo dos cortes da porção mediotemporal da FH impregnados pelo método de Golgi-Stensaas (279) incidiu particularmente nas células granulares da FD (Fig.9).

Os resultados da observação qualitativa destas células coincidiram com as descrições clássicas de Ramón y Cajal (244) e de Lorente de Nó (178), mais tarde aperfeiçoadas por outros autores (11,48,57,84,112,125,175,176,268,278,360) (Fig.9).

Trata-se de células com corpo relativamente pequeno em relação à arborização dendrítica que nele se origina. De forma quase constante, os dendritos primários surgiam do polo apical da célula e independentemente da sua orientação inicial dirigiam-se à camada molecular onde repetidamente se dividiam de modo dicotómico, distribuindo-se em área triangular cujo vértice correspondia ao soma (176) (Fig.9). Algumas vezes, contudo, estes dendritos emergiam dos lados do corpo celular, embora com distribuição e ramificação idênticas às descritas.

De acordo com as descrições de outros autores (112,125,176,268,360) verificou-se que o padrão de ramificação dendrítica das células variava conforme a situação do corpo celular na espessura da camada granular. Na verdade, as células mais profundamente situadas nesta camada, isto é, mais próximas do hilo da FD, davam origem a um único dendrito apical que sem se ramificar ascendia na camada granular entre as células que eram mais superficiais; somente ao atingir a camada molecular começava a ramificar-se de maneira semelhante aos dendritos das células mais superficialmente localizadas. Estas, por sua vez, possuíam 2 ou 3 dendritos primários que iniciavam a sua ramificação logo após a emergência do corpo celular, penetrando na camada molecular e muitas vezes atingindo o seu limite mais periférico. A área de extensão das arborizações dendríticas era variável, mas verificou-se que as células granulares situadas na crista denteada mostravam arborizações que se distribuíam por áreas mais extensas que as dos restantes neurónios (48,125,278).

Os dendritos apresentavam espinhas de forma e dimensões variáveis (85) e em número reduzido na porção inicial do dendrito (112); as dos segmentos dendríticos mais distais regra geral mostravam-se mais longas qua as dos segmentos situados na parte média da arborização (278) (Fig.10).

O axónio destas células tinha origem no polo basal do soma e dirigia-se ao hilo onde, obliquando, seguia um trajecto oposto à crista denteada (Fig.9). Embora raras vezes tivesse sido possível observar o trajecto dos axónios - fibras musgosas (Fig.9) - até à porção proximal dos dendritos apicais das células piramidais de CA3, a sua visualização era frequente na camada polimórfica do hilo formando um plexo de densidade variável, constituído por ramos finos dispostos em diferentes direcções, que correspondiam a colaterais dos axónios. As FM e as suas terminações ao nível da camada radiada de CA3 formavam a camada suprapiramidal (de Koelliker) ou estrato lúcido (de Ganser) da região inferior do hipocampo (12,34,57), logo acima da camada piramidal de CA3 (12,115); constituíam feixes com numerosos botões que atingiam as excrescências dendríticas (244) das porções proximais das árvores apicais das células piramidais de CA3, cruzando-as perpendicularmente.

A observação qualitativa dos cortes impregnados pela prata não permitiu verificar a existência de qualquer alteração morfológica das células que acabam de se descrever nos animais submetidos a alcoolização, seguida ou não de abstinência, em relação às dos animais dos grupos controlos.

2.1.2. Microscopia electrónica

2.1.2.1. Organização estrutural do neurópilo do estrato lúcido

A observação ultrastrutural da FH foi limitada ao estudo do neurópilo do estrato lúcido (Fig.11). Prestou-se particular atenção à estrutura fina das FM e seus terminais, bem como das sinapses destes com as excrescências espinhosas dos dendritos das células piramidais de CA3.

A organização estrutural era em tudo coincidente com as descrições da mesma área feitas por diversos autores no Rato (12,34), no Murganho (19), no Cobaio (33), no Coelho (130), no Gato (162) e no Macaco (335).

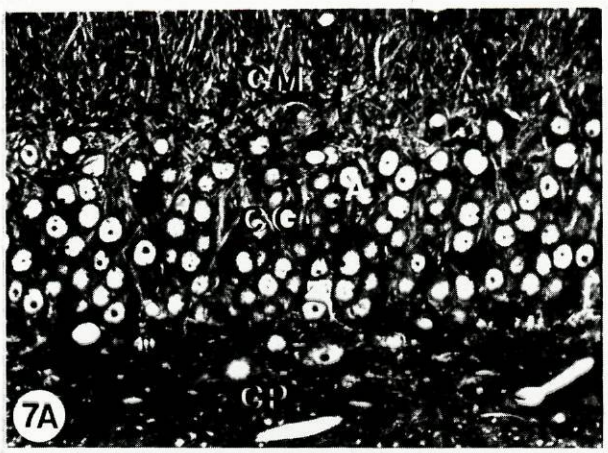
Trata-se de um neurópilo em que predominavam os terminais de grandes dimensões, designados de gigantes (34), e invaginados pelas espinhas das excrescências dendríticas (Fig.11). Reconheceram-se ainda perfis axonais de diferentes diâmetros, mielinizados ou não, e também perfis dendríticos seccionados segundo diferentes planos. Os prolongamentos gliais eram, nesta zona, pouco exuberantes (Fig.11).

Fig. 7. Lâmina lateral da camada granular da fáscia denteada visualizada em cortes semifinos. CM, camada molecular; CG, camada granular; CP, camada polimórfica do hilo. A- Controlo de 18 meses. B- 12 meses de alcoolização seguidos de 6 meses de abstinência (abstinência 2); note-se a franca redução do número de células granulares. Azul de toluidina. 325 X.

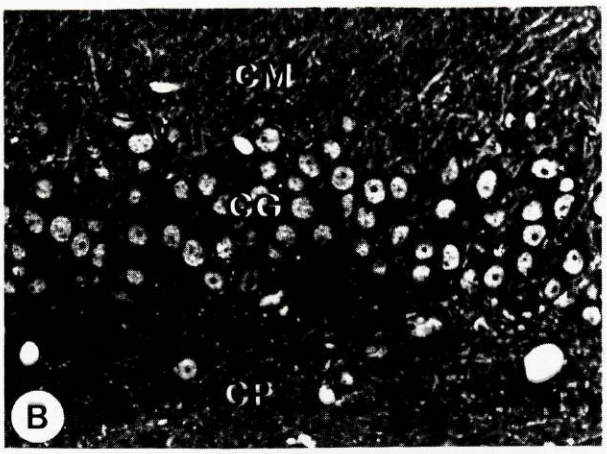
Fig. 8. Porção justa-hilar da camada piramidal de CA3 do hipocampo, visualizada em cortes semifinos. CR, camada radiada; CA3, camada piramidal; CO, camada *oriens*. A- Controlo de 18 meses. B- 18 meses de alcoolização; note-se a redução do número de células piramidais. Azul de toluidina. 325 X.

Fig. 9. Células granulares da lâmina medial da camada granular da fáscia denteada, impregnadas pelo método de Golgi. Em duas células é visível a parte inicial do axónio (fibra musgosa - setas) a dirigir-se para o hilo. As arborizações dendríticas têm o seu aspecto normal. Abstinência 2. 290 X.

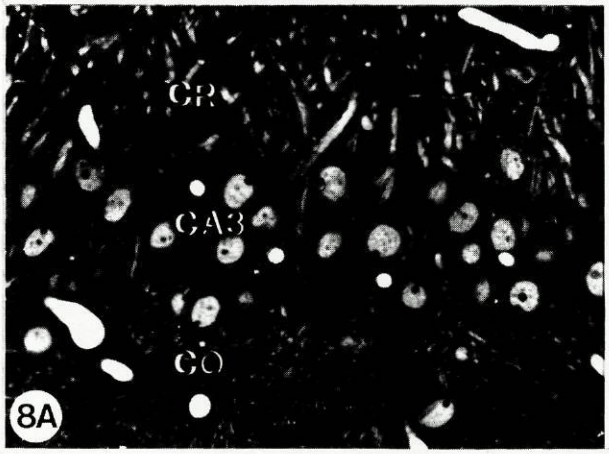
Fig. 10. Ramos dendríticos de uma célula granular da fáscia denteada impregnada pelo método de Golgi. De notar a presença de espinhas dendríticas de forma e dimensões diversas. Abstinência 2. 1.660 X.



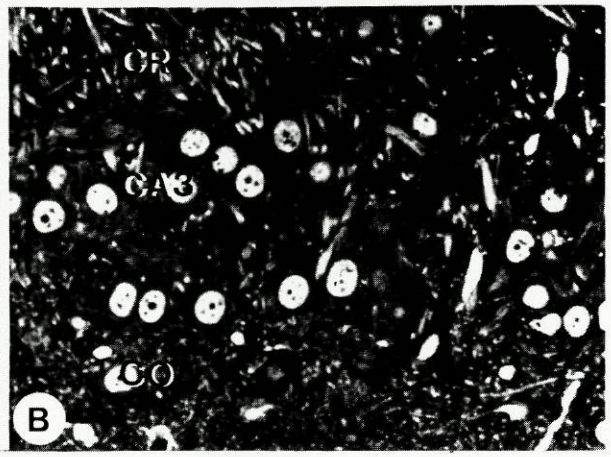
7A



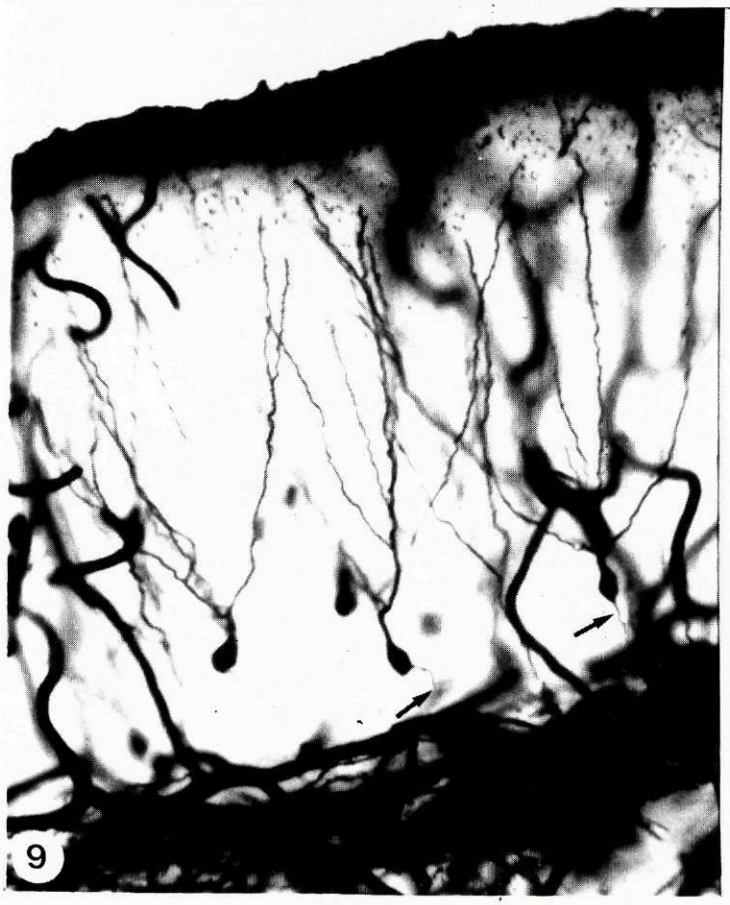
B



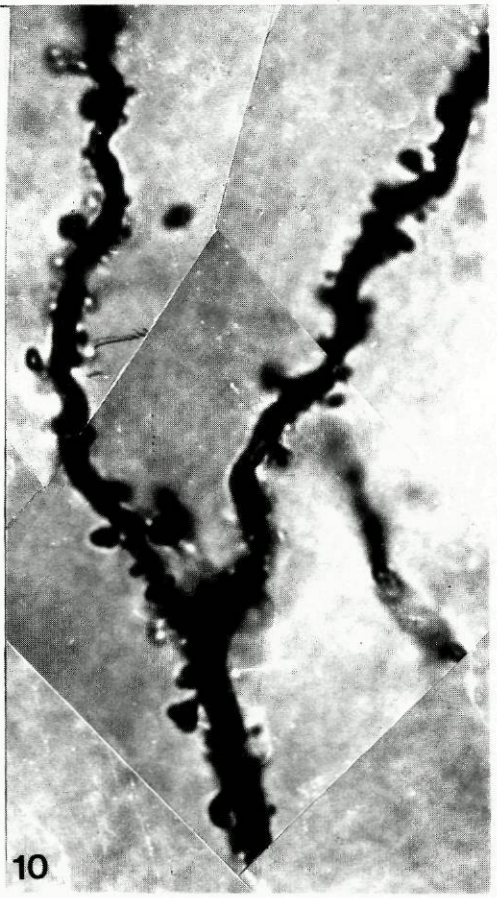
8A



B



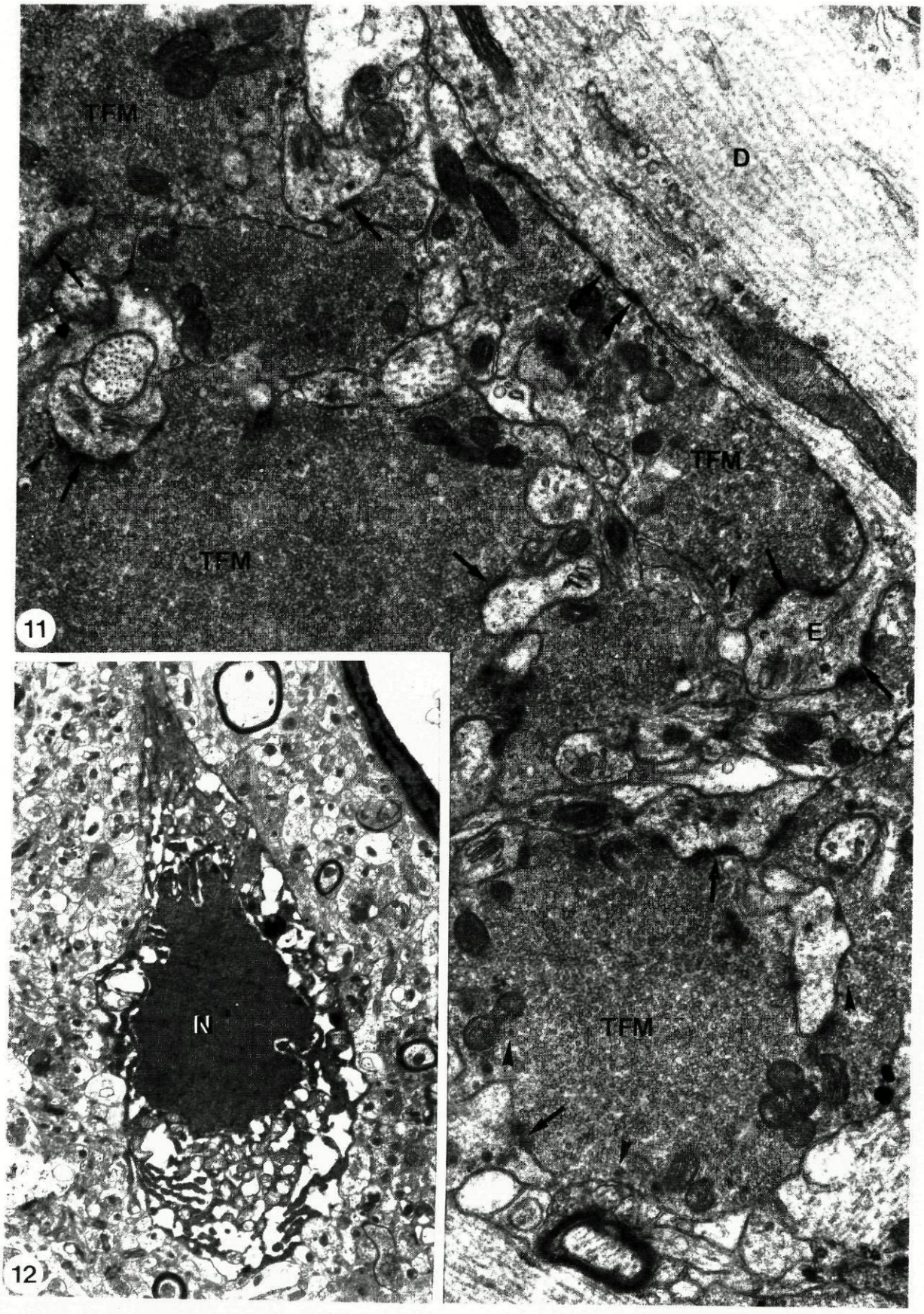
9



10

Fig. 11. Neurópilo do estrato lúcido. São visíveis perfis de terminais de fibras musgosas (TFM) de grande densidade vesicular. Distinguem-se algumas vesículas granulares (pontas de seta). São evidentes contactos sinápticos assimétricos com espinhas dendríticas (setas). No ângulo superior direito observa-se um grande tronco dendrítico (D) do qual nasce uma espinha (E) sobre a qual se estabelecem duas sinapses. Também neste tronco dendrítico são visíveis contactos juncionais de tipo desmosómico (duplas pontas de seta).12 meses de alcoolização. 24.000 X.

Fig. 12. Célula piramidal de CA3 em franca degenerescência: elevada densidade electrónica quer no seu núcleo (N) quer no citoplasma, e marcadas alterações estruturais citoplasmáticas, nomeadamente das mitocôndrias e do retículo endoplásmico. Abstinência 2. 6.000 X.


TFM
D
TFM
TFM
E
11
N
TFM
12

As FM surgiam como axónios não mielinizados, finos e geralmente associados em feixes compactos. Em cortes favoráveis foi possível observar FM a terminarem nos seus botões (12,34); porém, na generalidade das vezes, os botões gigantes encontravam-se isolados no neurópilo sem se vislumbrar qualquer continuidade com o axónio donde provinham (Fig.11).

Nos troncos dendríticos, mais ou menos longos, ou nos seccionados transversalmente, observaram-se excrescências dendríticas do tipo pediculado, ramificando-se em espinhas que se invaginavam nos terminais de forma típica (12,34,115,130) e característica do neurópilo desta zona. A par destas espinhas, que surgiam como que contidas no interior dos perfis dos terminais, outras eram visíveis bordejando a sua periferia. Na maioria dos casos, porém, não era possível observar-se a continuidade entre o tronco dendrítico, a excrescência e as suas espinhas e por isso estas surgiam isoladas. Tal como se descreveu para os perfis pediculados, também as espinhas isoladas se invaginavam nos terminais ou surgiam à sua periferia (Fig.11).

Os TFM apresentavam-se geralmente com dimensões consideráveis, frequentemente ultrapassando os 10 μm de dimensão máxima e ocupando fracção considerável do neurópilo. De configuração variável, mostravam-se repletos de vesículas esféricas e agranulares, de diâmetro compreendido entre 20 e 50 nm (12,34,112,115). Nalguns terminais vislumbravam-se vesículas de idêntico aspecto mas com diâmetro três ou quatro vezes superior (112) e ainda outras de dimensões um pouco menores mas granulares (34,112) (Fig.11). Em todos os terminais se viram mitocôndrias de reduzidas dimensões e em número variável, dispondo-se caracteristicamente à sua periferia (34,115) (Fig.11).

Os terminais estabeleciam múltiplos contactos especializados axodendríticos, de dois tipos (12,34,130) (Fig.11). Num dos tipos, entre os botões musgosos e as espinhas das excrescências dendríticas, assumiam geralmente aspectos encurvados, quer quando as espinhas se encontravam no interior dos botões quer quando se dispunham à sua periferia (Fig.11). Nestes contactos, tanto a membrana pré-sináptica como a pós-sináptica se apresentavam espessadas em zonas opostas, embora a densidade pós-sináptica fosse de maior espessura. As fendas eram bem evidentes, mostrando material no seu interior. Estas características levaram a considerar tais contactos como sinapses assimétricas ou do tipo I de Gray (12,34,112,115).

No outro tipo de contacto, que se verificava entre terminais musgosos e troncos dendríticos das células piramidais de CA3, as zonas de espessamentos membranosos eram de comprimento muito variável (Fig.11). Neste caso as especializações membranosas eram de espessura e densidade idênticas; não se verificava aumento da largura do espaço intermembranoso ao nível dos espessamentos, nem material electronicamente denso no seu interior (130). Além destas características, a ausência de maior concentração de vesículas junto do espessamento da membrana do terminal, que era comum no primeiro tipo, contribuiu para não se considerarem estes contactos como sinapses mas como especializações juncionais simétricas do tipo desmosómico (34,112,115,130) (Fig.11).

Em todos os animais, quer tratados pelo álcool quer sujeitos a abstinência, verificou-se que eram extremamente numerosos os perfis em degenerescência (Figs.12-16) a par de outros que mostravam características de actividade regenerativa. Os sinais de degenerescência eram em maior número à medida que aumentava a duração do período experimental, não se mostrando diminuídos nos grupos sujeitos a abstinência.

Dos perfis axonais degenerados (Figs.13, 14) os dos terminais musgosos eram os mais abundantes (Fig.14). Envolvidos por prolongamentos gliais mais ou menos extensos, apresentavam elevada densidade electrónica, consequência da densificação da matriz e da agregação das vesículas. As mitocôndrias mostravam as alterações estruturais típicas destes processos (122,223). Não se visualizaram outros tipos de degenerescência que não a densa acima descrita (18,59,122,150,222,247).

Frequentemente, encontravam-se aglomerados de perfis degenerados numa área restrita de neurópilo que se interpretaram como botões de uma mesma FM em degenerescência. A apoiar esta hipótese viram-se, embora raramente, casos em que se vislumbrou a FM e mais do que um perfil degenerado no mesmo campo. Nos terminais degenerados, mesmo em estádio muito avançado, mantinham-se visíveis os contactos sinápticos atrás descritos (Fig.14).

As grandes dimensões dos terminais musgosos tornam-os propícios a poderem ser alvo de "processos" de densificação em consequência de fenómenos de *shrinkage* (318). Nestes casos, porém, o aumento da densidade electrónica é exclusivamente devido à agregação vesicular e não é acompanhado das restantes características descritas.

A degenerescência dendrítica que, como se salientou já, era mais raramente observada que a axonal, apresentava dois tipos distintos. O mais frequente era a actividade degenerativa de tipo denso (Fig.15). Tal como acontecia com os axónios e seus botões, estes dendritos apresentavam-se com elevada densidade electrónica devido a alterações da sua matriz. Também eram visíveis alterações da estrutura das mitocôndrias. Nestes casos, e conforme o que está descrito noutras situações de degenerescência dendrítica deste tipo (222,223), eram muito evidentes os microtúbulos do perfil em degenerescência (Fig.15). Os terminais e os contactos sinápticos que estabeleciam com os perfis dendríticos degenerados não apresentavam alterações estruturais (223).

Ao contrário do que se verificava nos terminais, observaram-se formas de degenerescência dendrítica do tipo claro (127) (Fig.16), caracterizada pela presença, no interior do dendrito, de abundante material fibrilar e figuras de tipo lamelar (73). Ainda nestes casos, os terminais que estabeleciam contactos sinápticos com tais dendritos mantinham preservada a sua estrutura (Fig.16).

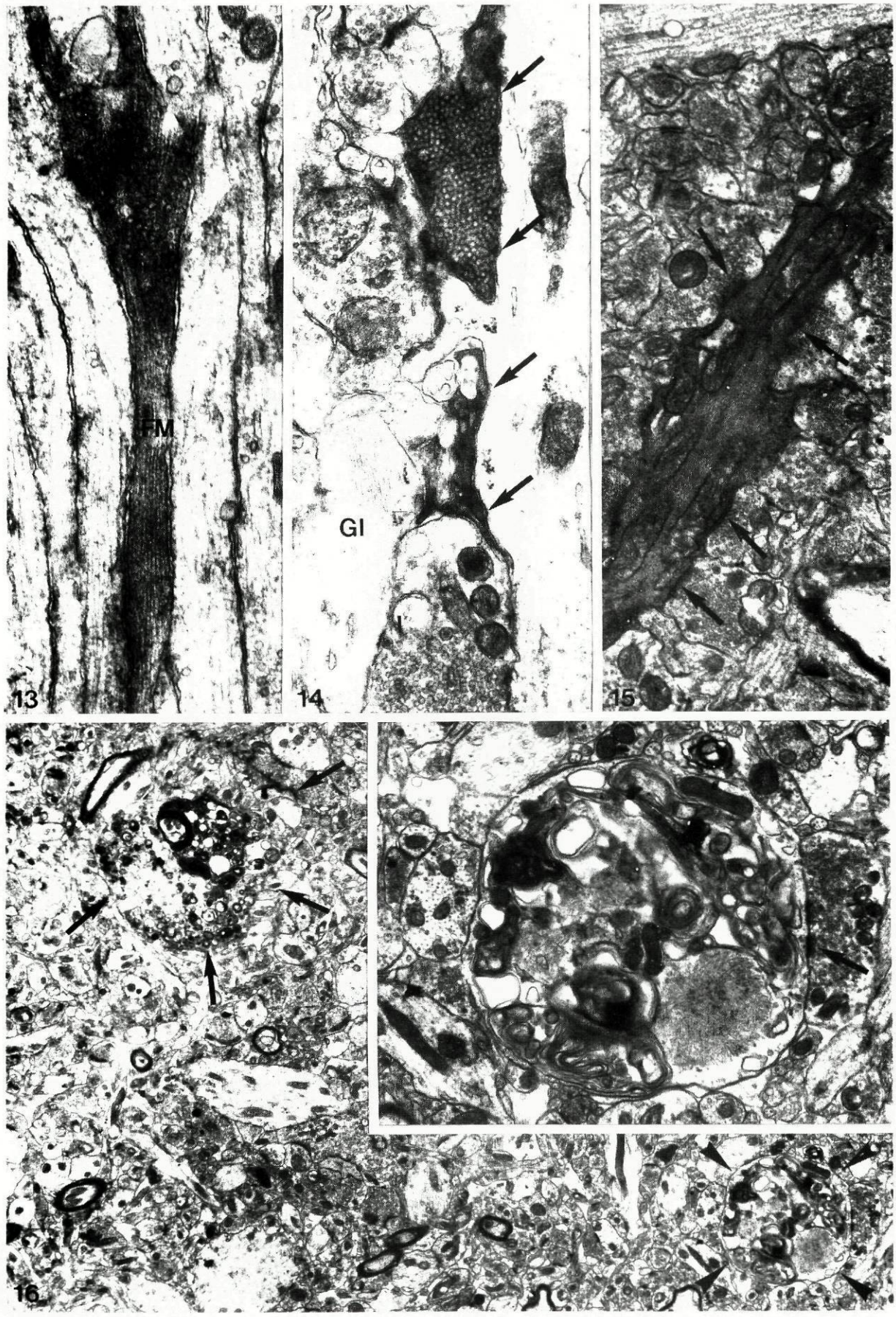
Para além da degenerescência axonal e dendrítica descrita, eram ainda frequentemente visíveis no neurópilo do estrato lúcido dos animais submetidos a alcoolização, seguida ou não de abstinência, perfis degenerados cuja origem era impossível determinar. Uns, pelo facto do processo de degenerescência densa estar de tal modo avançado que não permitia caracterizá-los ultrastruturalmente. Outros, os designados neuritos distróficos (216), dado que as suas grandes dimensões e a presença de numerosos corpos densos e lamelares tornavam impossível compará-los com os prolongamentos neuronais existentes no neurópilo desta zona (Fig.16).

Fig. 13. Fibra musgosa (FM) do estrato lúcido que se continua por um botão, ambos em degenerescência. O aumento da densidade electrónica destes perfis e da rede microtubular é muito evidente. Abstinência 1. 31.500 X.

Fig. 14. Terminais de fibras musgosas (setas) mostrando sinais francos de degenerescência. É visível a densificação da matriz e a agregação das vesículas. Observam-se prolongamentos gliais (Gl) na proximidade dos referidos perfis. 18 meses de alcoolização. 22.500 X.

Fig. 15. Dendrito em degenerescência no estrato lúcido, no qual é evidente a marcada densidade electrónica da matriz. Reconhecem-se contactos sinápticos de configuração normal (setas). Abstinência 2. 18.000 X.

Fig. 16. Estrato lúcido onde se observa um perfil não identificável (setas) com sinais de degenerescência avançada (neurito distrófico); distinguem-se-lhe corpos densos, vacuolares e lamelares. Visualiza-se ainda o perfil de um dendrito em degenerescência de tipo claro (pontas de seta) onde se identifica abundante material fibrilar e figuras de tipo lamelar. 18 meses de alcoolização. 6.000 X.
Inserido - Maior ampliação do perfil dendrítico, no qual se observa um contacto sináptico com terminal vizinho (seta). 14.000 X.


FM
GI
13
14
15
16

Embora neste neurópilo não abundem fibras mielinizadas, visualizaram-se processos de dismielinização. Em alguns casos observaram-se baínhas de mielina a envolver axónios distróficos e áreas de neurópilo adjacentes. Noutros casos, menos complexos, o típico arranjo das lamelas mielínicas estava profundamente alterado.

Ao lado destes processos degenerativos foram frequentemente visíveis perfis com numerosas mitocôndrias alongadas e de matriz densa, semelhantes às que se observam nos prolongamentos neuronais em crescimento (235,362).

2.2. Estudos quantitativos

2.2.1. Espessura da área denteada e de camadas da formação do hipocampo

Os valores dos resultados da espessura da AD, das camadas granular e molecular da FD e da camada piramidal de CA3, determinada em cortes semifinos, encontram-se representados nas Figuras 17 a 20.

2.2.1.1. Área denteada

A Figura 17 representa graficamente os valores dos resultados encontrados para a espessura da área denteada. Verificou-se que não havia diferenças significativas comparando os grupos alcoolizados e controlos da mesma idade. Do mesmo modo, a análise de variância,

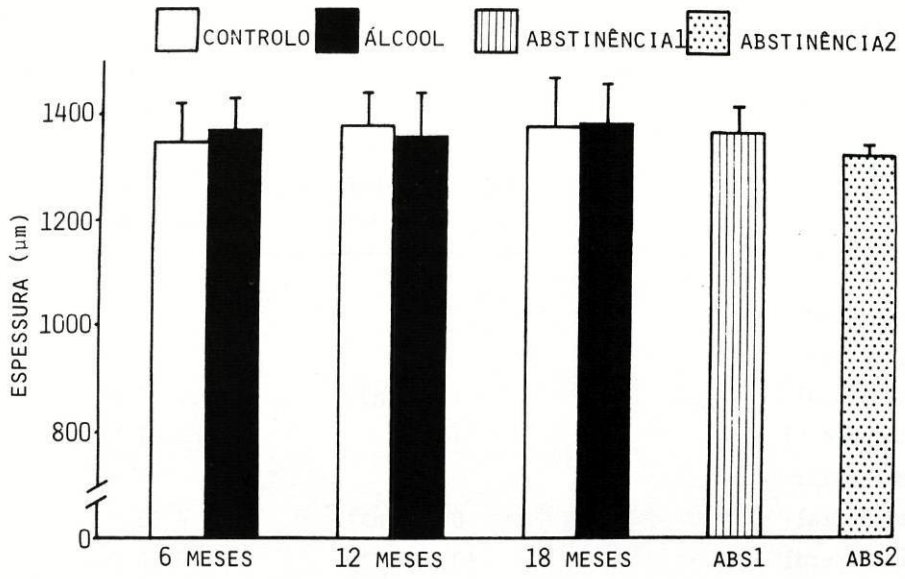


Fig. 17. Espessura da área denteada nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,05$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,01$.

tendo em conta o tempo de experiência e a ingestão de álcool, não revelou variações significativas (Quadro 1).

Considerando os grupos de abstinência, verificou-se que somente o grupo de abstinência 2 apresentava diminuição significativa desta espessura em relação à dos grupos com a mesma idade quer alcoolizados quer controlos (Fig.17).

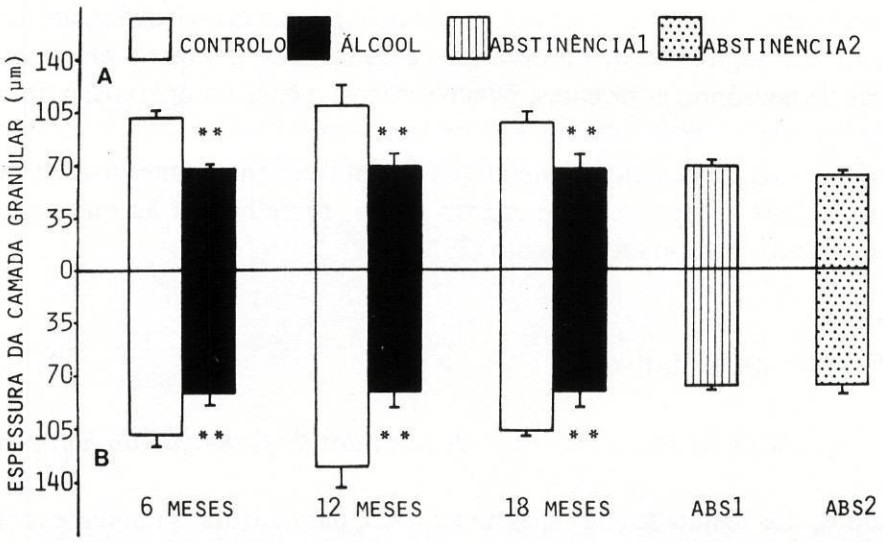


Fig. 18. Espessura das lâminas medial (A) e lateral (B) da camada granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ** p<0,01. Em ambas as lâminas: ABS1 vs 12M Controlo, p<0,01; ABS2 vs 18M Controlo, p<0,01.

QUADRO 1

Resultados da aplicação da ANOVA para dois factores aos dados quantitativos obtidos nos cortes da FH incluída em epon nos grupos de animais de 6,12 e 18 meses

	Valores de F		
	Tempo de experiência (gl 2,30)	Álcool (gl 1,30)	Interacção (gl 2,30)
Espessura das camadas			
Camada granular			
Lâmina medial	1,61 (ns)	121,87 ***	0,83 (ns)
Lâmina lateral	4,08 *	89,91 ***	4,02 *
Camada molecular			
Porção medial	0,34 (ns)	4,53 *	0,22 (ns)
Porção lateral	10,14 ***	0,10 (ns)	0,06 (ns)
Camada piramidal (CA3)	0,56 (ns)	20,68 ***	0,91 (ns)
N_V das células granulares	3,92 *	104,04 ***	0,09 (ns)
N_V das células piramidais de CA3	1,76 (ns)	127,14 ***	1,50 (ns)
N_V das sinapses TFM/CA3	3,29 (ns)	1,16 (ns)	1,93 (ns)
Fracção da membrana dos TFM ocupada por zonas activas	4,43 *	29,71 ***	0,81 (ns)
V_V dos terminais das FM	6,52 **	14,13 ***	0,22 (ns)

gl, graus de liberdade; ns, não significativo; *p<0.05; **p<0,01; ***p<0,001

2.2.1.2. Camada granular da fáscia denteada

Os resultados encontrados para a espessura das lâminas medial e lateral da camada granular da FD estão representados na Figura 18. Verificou-se que havia redução significativa da espessura de ambas as lâminas nos três grupos submetidos a alcoolização quando comparados com os respectivos controlos. No respeitante aos grupos de abstinência 1 e abstinência 2, os valores encontrados para a espessura de ambas as lâminas, muito idênticos aos dos grupos de animais alcoolizados, mostraram-se significativamente menores quando se comparou cada um dos grupos com o controlo da mesma idade (Fig.18).

2.2.1.3. Camada molecular da fáscia denteada

Como se pode ver na representação gráfica da Figura 19, apresentam-se separadamente

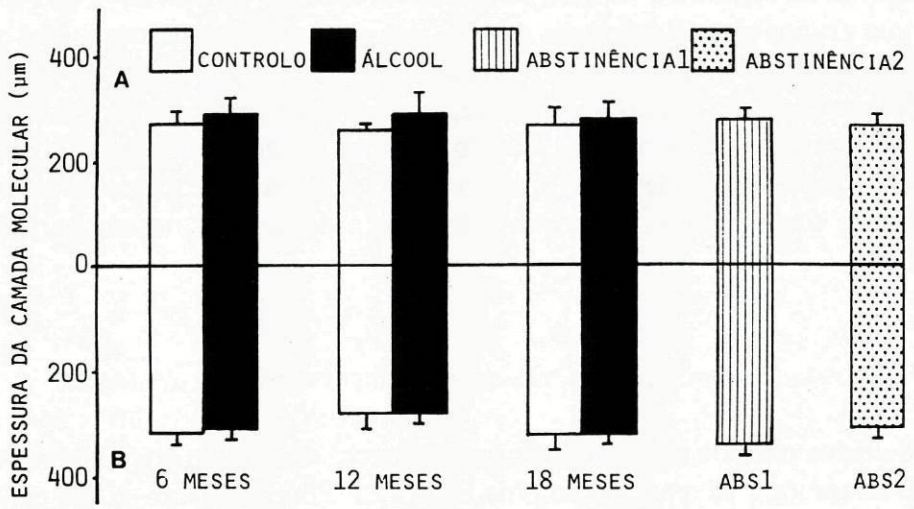


Fig. 19. Espessura das porções medial (A) e lateral (B) da camada molecular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. Na porção lateral: ABS1 vs 12M Controlo, p<0,01; ABS1 vs 12M Álcool, p<0,01.

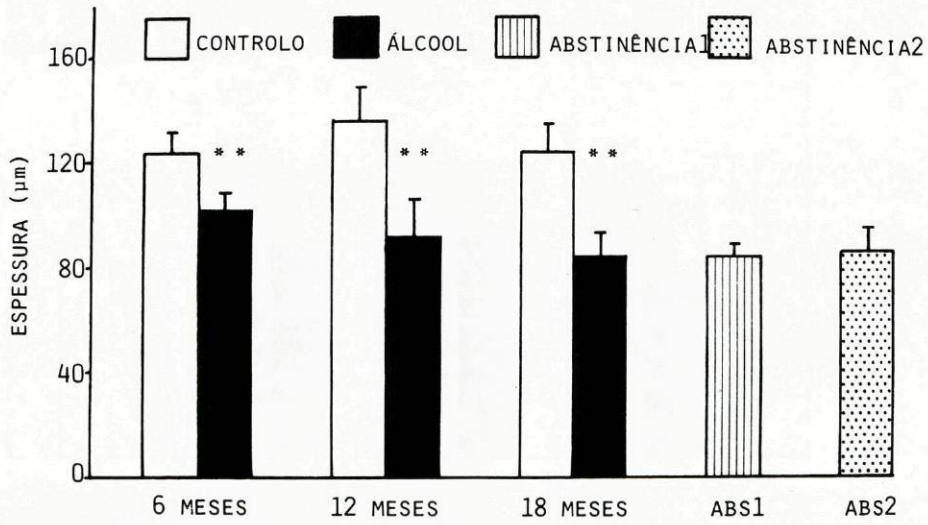


Fig. 20. Espessura da camada piramidal de CA3 nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ** p<0,01. ABS1 vs 12M Controlo, p<0,01; ABS1 vs 6M Álcool, p<0,01; ABS2 vs 18M Controlo, p<0,01.

os valores das determinações das espessuras das porções medial e lateral desta camada. A análise dos resultados mostrou que não havia diferenças significativas entre os três grupos alcoolizados e os respectivos controlos. A aplicação da ANOVA indicou que havia unicamente efeito do tempo de experiência na espessura da porção lateral da camada molecular (Quadro 1)..

Relativamente aos dois grupos de abstinência, não se encontraram variações significativas na espessura da porção medial quando os resultados obtidos foram comparados com os dos alcoolizados e controlos da mesma idade e com os dos grupos que receberam etanol por iguais períodos de tempo. Em relação à espessura da porção lateral, verificou-se que o grupo de abstinência 1 apresentava aumento significativo quando se comparavam os resultados com os dos grupos alcoolizado e controlo da mesma idade (Fig.19).

2.2.1.4. Camada piramidal de CA3

Pela análise da Figura 20 verifica-se que havia redução significativa da espessura desta camada nos três grupos alcoolizados em relação aos controlos da mesma idade. A análise de variância destes resultados, levando em conta os dois factores já referidos, mostrou que esta diminuição da espessura era exclusivamente dependente da ingestão de álcool (Quadro 1).

Nos dois grupos de abstinência constatou-se uma redução significativa em relação aos grupos controlos da mesma idade; além disso, o valor encontrado no grupo de abstinência 1 era significativamente menor que o do grupo alcoolizado durante o mesmo período de tempo (Fig.20).

2.2.2. Densidade numérica das células granulares da fáscia denteada

Os resultados obtidos na determinação do número de células granulares por unidade de volume de FD encontram-se representados na Figura 21. Pode verificar-se que os valores desta densidade nos três grupos de animais alcoolizados (6, 12 e 18 meses) eram significativamente menores que os encontrados nos controlos da mesma idade. A análise de variância destes resultados, considerando os factores tempo de experiência e ingestão de álcool, permitiu concluir

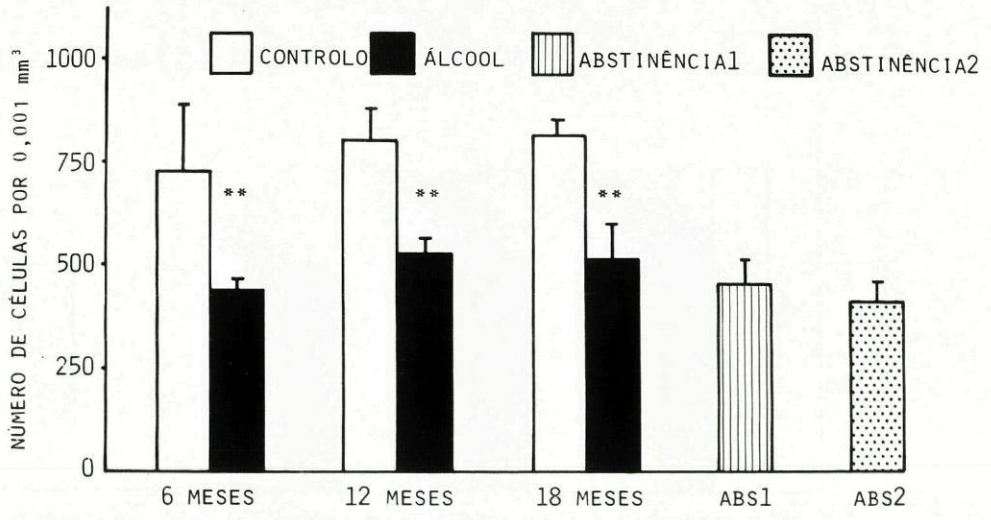


Fig. 21. Densidade numérica das células granulares da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ** p<0,01. ABS1 vs 12M Controlo, p<0,01; ABS1 vs 12M Álcool, p<0,05; ABS2 vs 18M Controlo, p<0,01; ABS2 vs 18M Álcool, p<0,05; ABS2 vs 12M Álcool, p<0,01.

que a redução era dependente de ambos (Quadro 1).

Os valores dos resultados dos dois grupos de abstinência eram significativamente inferiores, em cada grupo, aos dos grupos tanto alcoolizados como controlos da mesma idade. Além disso, embora não se tenha verificado variação significativa quando se comparavam os valores do grupo de abstinência 1 com os do grupo submetido a alcoolização durante período de tempo igual (6 meses), o valor do N_v do grupo de abstinência 2 era significativamente menor que o do grupo alcoolizado durante 12 meses (Fig.21).

2.2.3. Densidade numérica das células piramidais de CA3

A Figura 22 mostra a representação gráfica dos resultados obtidos na determinação do N_v das células piramidais de CA3 realizada em todos os grupos estudados. A análise destes resultados permitiu concluir que nos três grupos de animais alcoolizados (6,12 e 18 meses) se verificava diminuição significativa do valor do N_v, quando cada grupo era comparado com o respectivo controlo. A análise de variância indicou que a referida redução numérica era devida à ingestão de álcool (Quadro 1).

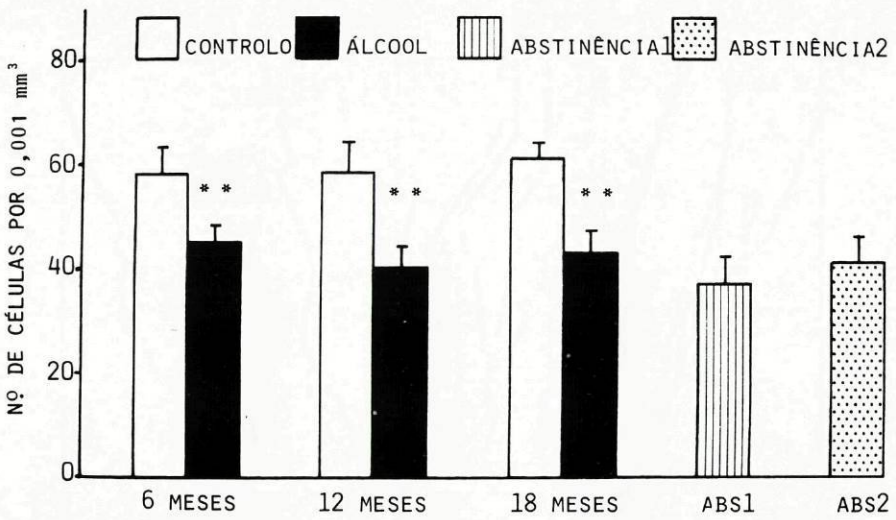


Fig. 22. Densidade numérica das células piramidais de CA3 nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ** p<0,01. ABS1 vs 12M Controlo, p<0,01; ABS1 vs 6M Álcool, p<0,01; ABS2 vs 18M Controlo, p<0,01.

O valor do N_v no grupo de abstinência 1 era significativamente menor que o encontrado quer no grupo controlo da mesma idade quer no grupo que recebeu álcool por igual período de tempo (6 meses). No grupo de abstinência 2, aquele valor era significativamente menor que o encontrado no grupo controlo com a mesma idade (20 meses), não diferindo do do grupo que recebeu álcool por igual período de tempo (Fig.22).

2.2.4. Estudos quantitativos com o método de Golgi

2.2.4.1. Análise métrica das arborizações dendríticas

A análise métrica das arborizações dendríticas das células granulares da FD restringiu-se aos animais de unicamente 5 grupos (6 e 18 meses de alcoolização, respectivos controlos e grupo de abstinência 2), pelas razões já apontadas no capítulo "Material e Métodos" (3.2.1.1.).

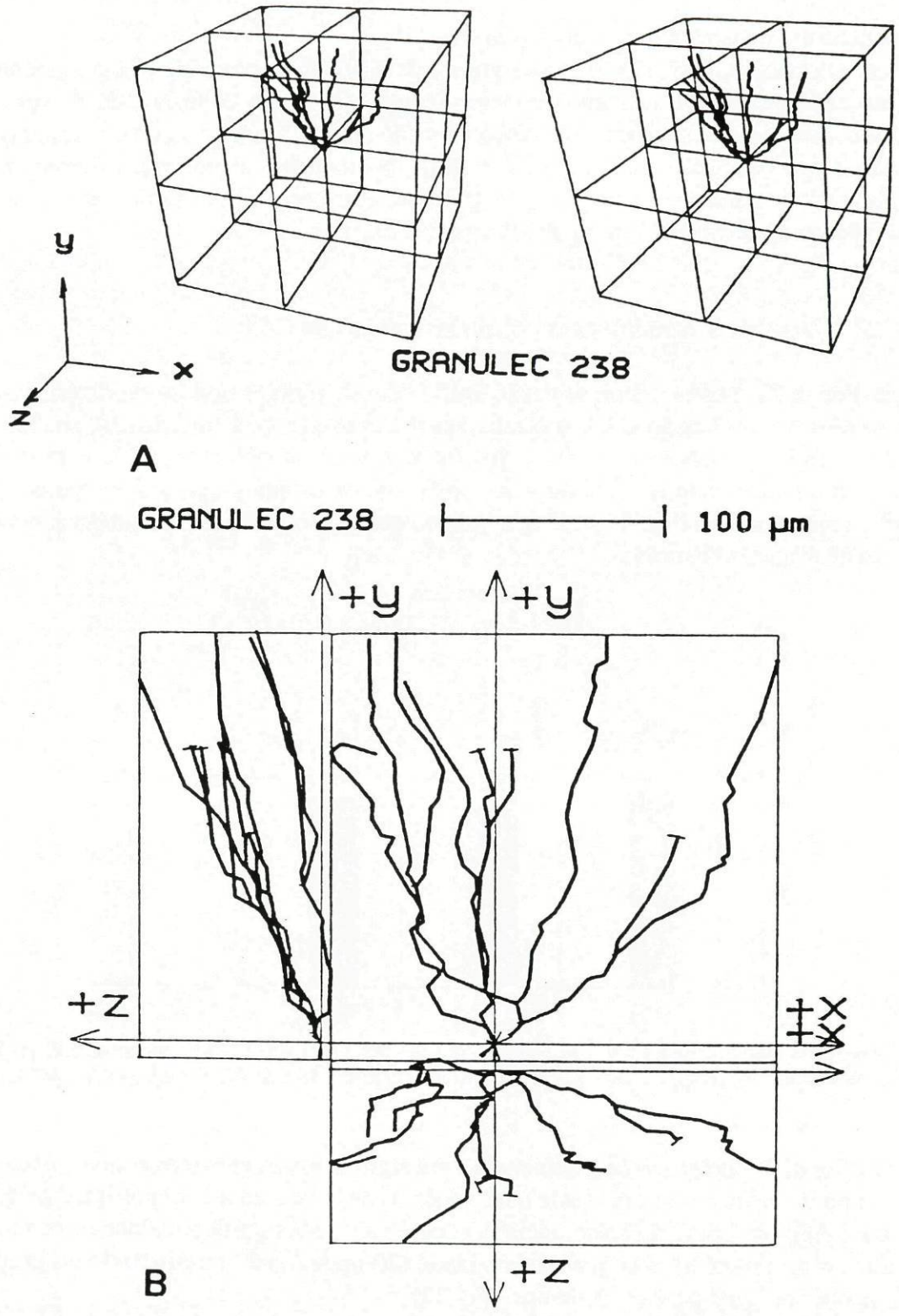


Fig. 23. Gráfico tridimensional (A) e respectiva projecção ortogonal (B) computorizados da arborização dendrítica de uma célula granular. Em A a representação corresponde a um par estereoscópico do mesmo campo dendrítico. 18 meses de alcoolização.

A Figura 23 mostra um exemplo de gráfico tridimensional e da respectiva projecção ortogonal da arborização dendrítica (comparar com a Fig.9) de uma das células granulares analisadas num animal de 18 meses de alcoolização. A primeira representação (Fig.23-A) possibilita uma visão estereoscópica da arborização dendrítica onde é possível visualizar a distri-

buição relativa e a orientação dos diferentes dendritos e respectivos ramos. Na segunda (Fig.23-B) pode observar-se a disposição da mesma arborização quando projectada ortogonalmente, bem como distinguir os ramos dendríticos terminais e os segmentos cortados (311).

Os valores médios, por grupo de animais, obtidos nas medições de cada um dos parâmetros estudados, por célula, e que a seguir se discriminam, encontram-se representados nas Figuras 24 a 33.

Os diversos parâmetros foram considerados em dois grupos (311). Um, referido aos parâmetros métricos gerais, englobava a área somática (Fig.24), o número total de dendritos (Fig.25), o número total de segmentos (Fig.26), o comprimento dendrítico total (Fig. 27) e a distância radial (Fig.28). O outro dizia respeito aos parâmetros métricos dos segmentos e agrupava o comprimento dos segmentos intermediários de grau = 2 (itt) (Fig.29) e de grau $\geq$ 4 (iii) (Fig. 30) e dos segmentos terminais em conjunto (Fig.31) e também por ordem (ordens 1 a 4) (Figs.32, 33).

Os resultados respeitantes aos segmentos intermediários do tipo itt quer de grau = 3 quer de grau $\geq$ 4 e aos segmentos terminais de ordem 0 e 5 não foram comparados e não são referidos pois o número destes segmentos em alguns dos animais estudados era insuficiente para uma análise estatística sólida.

2.2.4.1.1. Parâmetros métricos gerais

Os valores encontrados para a área somática (Fig.24) e para o comprimento dendrítico total (Fig.27) eram significativamente mais elevados nos grupos alcoolizados (6 e 18 meses) que nos controlos da mesma idade. A análise de variância indicou que o aumento verificado em ambos os parâmetros era dependente da ingestão de álcool e do tempo de experiência (Quadro 2).

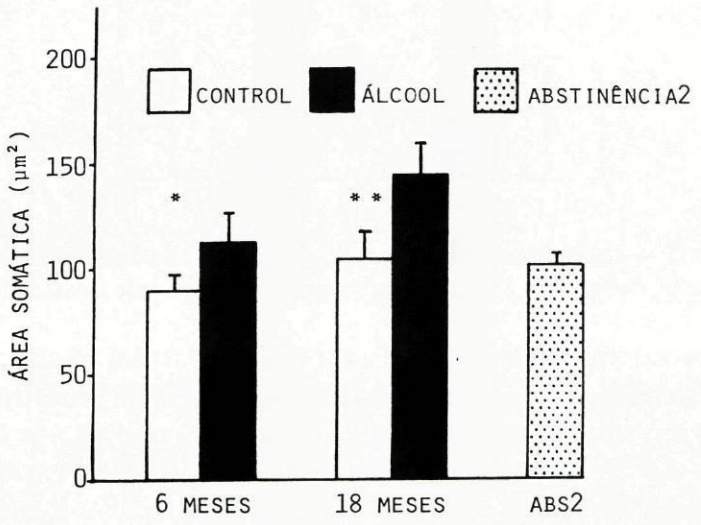


Fig. 24. Área somática das células granulares da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. * p<0,05; ** p<0,01. ABS2 vs 18M Álcool, p<0,01.

Embora o número total de dendritos (Fig.25) e o número total de segmentos (Fig.26) se mostrassem aumentados nos dois grupos alcoolizados quando comparados com os respectivos controlos, tais aumentos não eram significativos. A aplicação da ANOVA, no entanto, permitiu inferir que o aumento do número total de segmentos por célula era dependente do tratamento pelo álcool (Quadro 2).

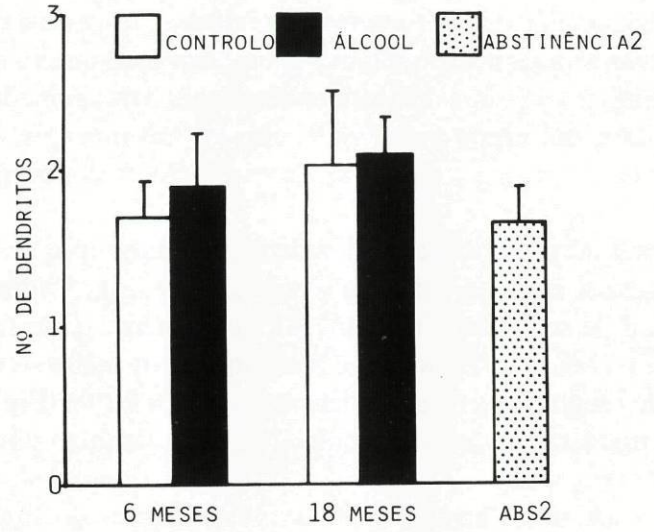


Fig. 25. Número total de dendritos por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,05$.

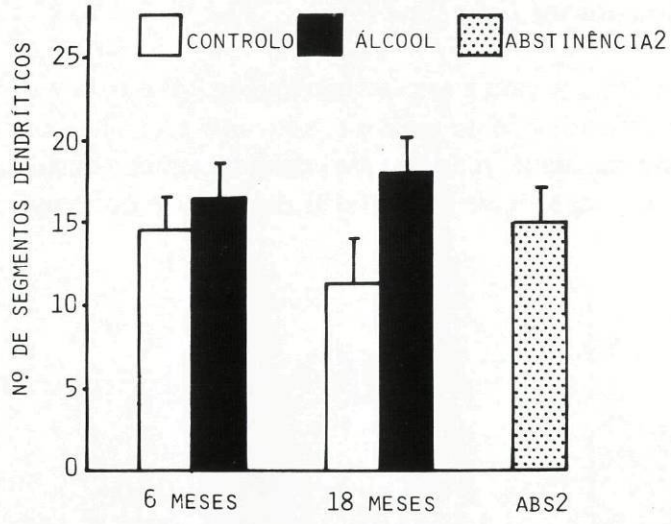


Fig. 26. Número de segmentos dendríticos por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2.

A análise dos valores encontrados para a distância radial (distância entre o centro do soma celular e a extremidade dos segmentos terminais) (Fig.28) mostrou aumento nos dois grupos alcoolizados em relação aos respectivos controlos, embora somente significativo no grupo de 6 meses. A ANOVA indicou que o aumento verificado estava relacionado com a ingestão de álcool e com o tempo de experiência, sendo significativa a interacção entre os dois factores (Quadro 2).

Quando se compararam os resultados entre os grupos de abstinência e controlo da mesma idade, verificou-se que não havia variações significativas para qualquer dos parâmetros atrás referidos (Figs.24 a 28).

No entanto, verificou-se que a diminuição dos valores da área somática (Fig.24), do número e comprimento totais dos dendritos (Figs.25,27) e da distância radial (Fig.28) encontrados no grupo de abstinência eram significativas em relação ao grupo de 18 meses de alcoolização. Embora também no respeitante ao número de segmentos (Fig.26) se verificasse redução do seu valor no grupo de abstinência, tal variação não era, no entanto, significativa.

QUADRO 2

Resultados da aplicação da ANOVA para dois factores aos dados quantitativos obtidos nas células granulares da FD impregnadas pela prata nos grupos de animais de 6 e 18 meses

	Valores de F		
	Tempo de experiência (gl 1,16)	Álcool (gl 1,16)	Interacção (gl 1,16)
Área somática	15,43 **	24,11 ***	1,99 (ns)
Número de dendritos	2,96 (ns)	0,76 (ns)	0,19 (ns)
Número de segmentos	0,58 (ns)	6,69 *	0,71 (ns)
Comprimento dendrítico total	11,84 **	16,32 ***	0,08 (ns)
Comprimento dos segm. terminais	21,71 ***	4,43 *	3,22 (ns)
Comprimento dos segm. intermediários			
Grau = 2	1,27 (ns)	13,35 **	0,83 (ns)
Grau ⩾ 4	0,55 (ns)	6,52 *	0,88 (ns)
Distância radial	22,30 ***	19,32 ***	192,44 ***
Densidade das espinhas dendríticas			
Terço interno	0,46 (ns)	0,06 (ns)	1,85 (ns)
Terço externo	0,42 (ns)	0,28 (ns)	0,87 (ns)

gl, graus de liberdade; ns, não significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

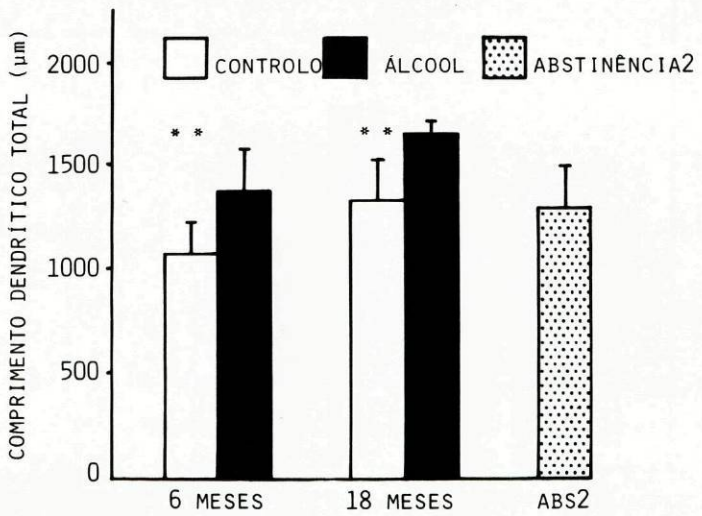


Fig. 27. Comprimento dendrítico total por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ** p<0,01. ABS2 vs 18M Álcool, p<0,01.

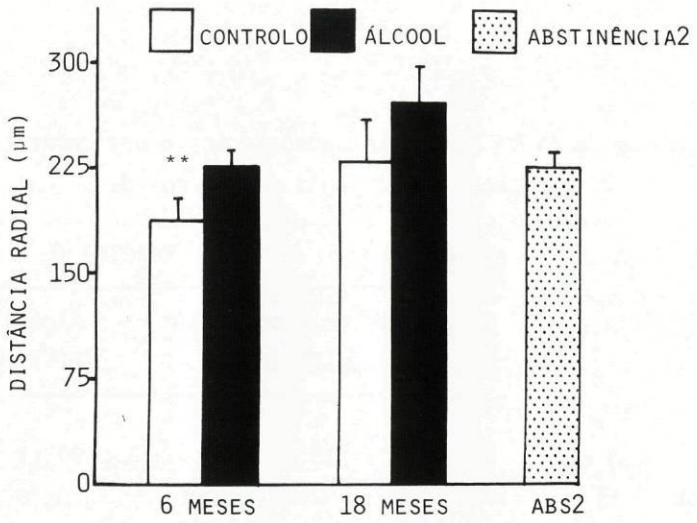


Fig. 28. Distância entre o centro do soma e as extremidades dos segmentos terminais (distância radial) das células granulares da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ** p<0,01. ABS2 vs 18M Álcool, p<0,01.

2.2.4.1.2. Parâmetros métricos dos segmentos

Os valores respeitantes ao comprimento dos segmentos intermediários, quer de grau = 2 (itt) (Fig.29) quer de grau ≥ 4 (iii) (Fig.30), encontravam-se aumentados nos grupos alcoolizados (6 e 18 meses) em relação aos controlos da mesma idade. No entanto, se para os segmentos de grau = 2 o aumento era significativo nos dois grupos sujeitos a períodos diferentes de alcoolização, para os segmentos de grau ≥ 4 a significância só se verificava quando se comparavam entre si os grupos de 18 meses de alcoolização e respectivo controlo. A análise de variância indicou que o referido aumento era devido ao álcool, quer nos segmentos de grau = 2 quer nos de grau ≥ 4 (Quadro 2).

No respeitante ao comprimento dos segmentos terminais (Fig.31) verificou-se que estava significativamente aumentado aos 6 meses de alcoolização; aos 18 meses não se encontravam diferenças entre os grupos alcoolizado e controlo. A análise de variância permitiu concluir que aquele aumento dependia do álcool e do tempo de experiência (Quadro 2).

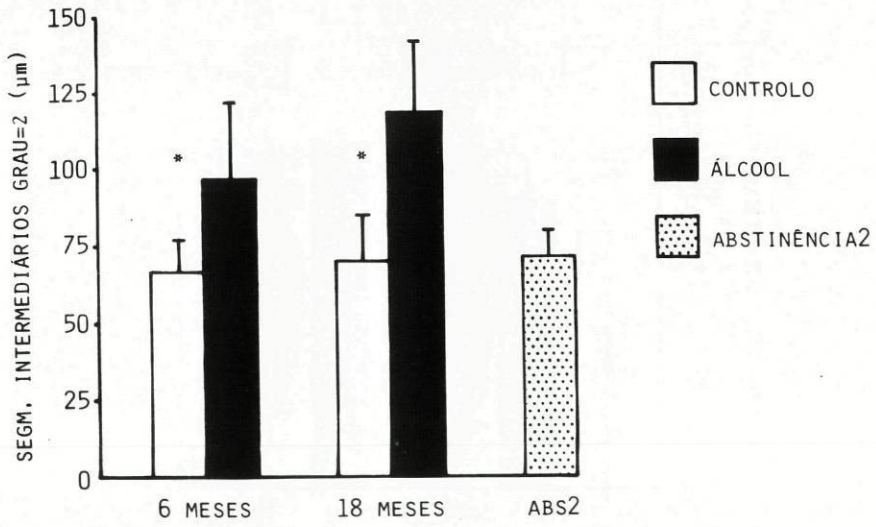


Fig. 29. Comprimento dos segmentos intermediários (grau = 2) por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. * p<0,05. ABS2 vs 18M Álcool, p<0,05.

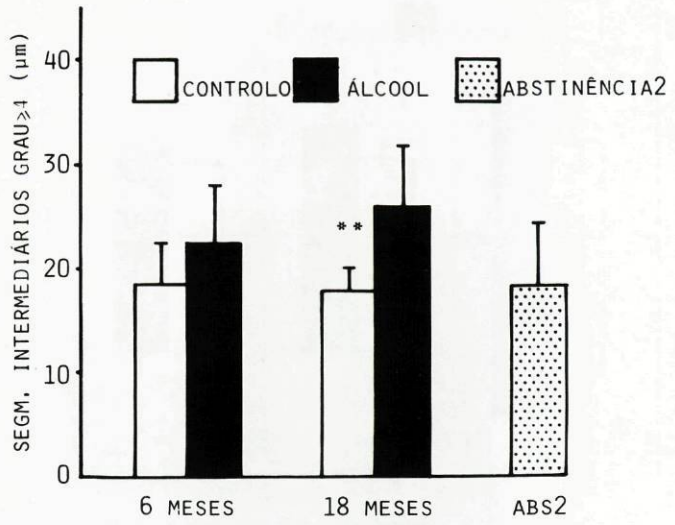


Fig. 30. Comprimento dos segmentos intermediários (grau ≥ 4) por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ** p<0,01.

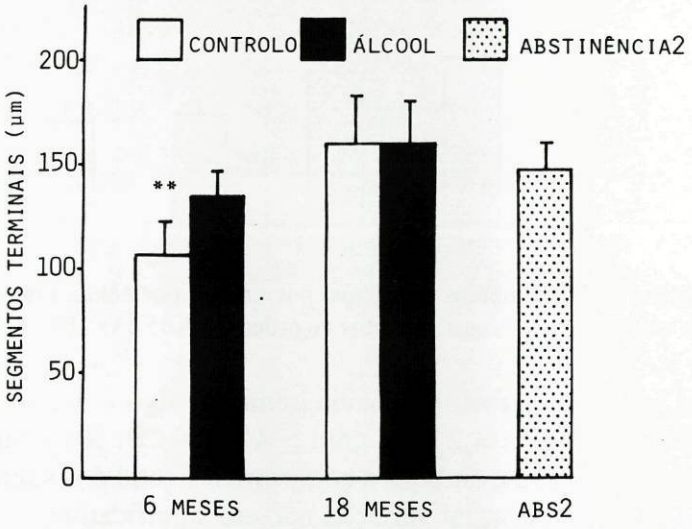


Fig. 31. Comprimento dos segmentos terminais por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ** p<0,01.

Quanto ao comprimento dos segmentos terminais, por ordem (Fig.32), verificou-se que no grupo de 6 meses de alcoolização estava aumentado, em todas as ordens estudadas, quando se comparavam os resultados com os do respectivo grupo controlo; contudo, o aumento era significativo somente nos segmentos de ordem 1, 2 e 4. No grupo de 18 meses de alcoolização também se verificou aumento do comprimento nos segmentos de ordem 1, 2 e 3 e redução nos de ordem 4, em relação aos encontrados no grupo controlo; no entanto, o aumento só era significativo nos segmentos de ordem 1.

Analisando os resultados do grupo de abstinência, verificou-se que os valores encontrados para o comprimento dos segmentos intermediários de grau = 2 e de grau ≥ 4 (Figs.29, 30) não variavam significativamente em relação aos do grupo controlo da mesma idade, o mesmo sucedendo ao comprimento dos segmentos terminais quer total (Fig.31) quer considerado por ordem (Figs.32, 33). No entanto, a comparação dos resultados obtidos no estudo dos parâmetros métricos dos segmentos no grupo de abstinência com os encontrados no grupo alcooli-

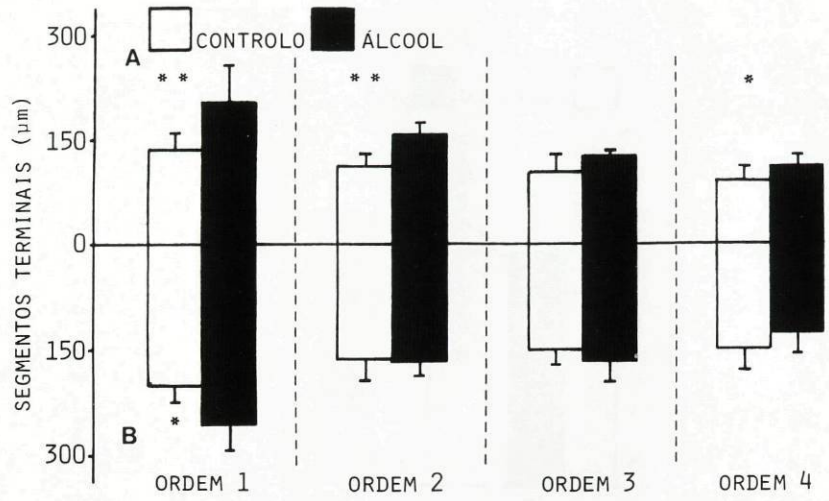


Fig. 32. Comprimento dos segmentos terminais, por ordem, por célula granular da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 (A) e 18 (B) meses e respectivos controlos. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

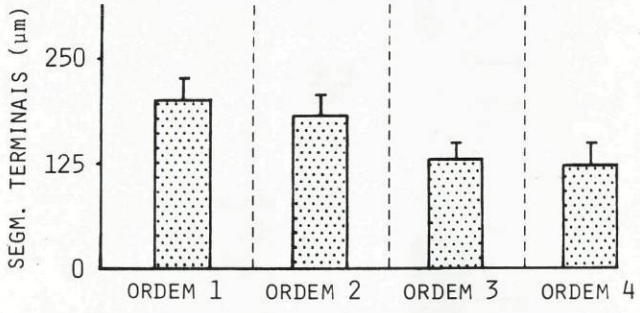


Fig. 33. Comprimento dos segmentos terminais, por ordem, por célula granular da fáscia denteada no grupo de abstinência 2. Nos segmentos de ordem 1: ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,05$.

zado com a mesma idade mostrou que havia redução significativa do comprimento dos segmentos intermediários de grau = 2 e de grau $\geq$ 4 (Figs. 29, 30) e também dos segmentos terminais de ordem 1 (Figs.32, 33); embora o comprimento total dos segmentos terminais (Fig. 31) mostrasse redução do seu valor, tal variação não era significativa.

2.2.4.1.3. Densidade das espinhas dendríticas

As contagens do número de espinhas dendríticas foram realizadas nas mesmas células onde se efectuou a análise métrica e topológica das respectivas arborizações dendríticas. Contaram-se as espinhas visualizadas em dendritos do terço interno e do terço externo da camada molecular.

Os resultados obtidos encontram-se graficamente representados, por grupos de animais, na Figura 34.

Verificou-se que aos 6 meses de alcoolização havia ligeira diminuição da densidade das espinhas em relação ao grupo controlo da mesma idade, quer no terço interno quer no terço externo das respectivas arborizações; contrariamente, aos 18 meses de alcoolização verificava-se aumento do seu número nas duas áreas analisadas, quando os resultados eram comparados com os do respectivo grupo controlo. No entanto, nenhuma destas variações era estatisticamente significativa quer entre os grupos alcoolizados e respectivos controlos quer na análise de variância (Quadro 2).

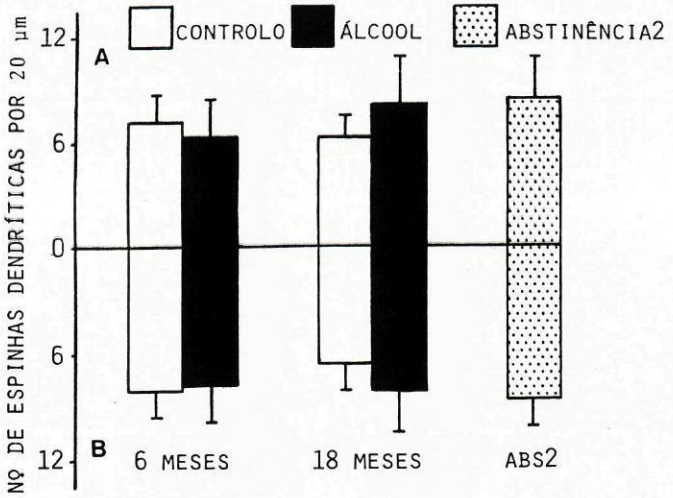


Fig. 34. Densidade das espinhas dendríticas nos terços interno (A) e externo (B) das árvores dendríticas das células granulares da fáscia denteada nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2.

Em relação ao grupo de abstinência, os valores encontrados não eram significativamente diferentes dos dos grupos controlo e alcoolizado da mesma idade (Fig.34).

2.2.4.2. Análise topológica das arborizações dendríticas

Os resultados obtidos relativos à frequência das partições das árvores dendríticas das células granulares da FD dos animais dos cinco grupos estudados e as comparações efectuadas entre eles incluíram a totalidade das partições, completas e incompletas, discriminadas naquelas árvores dendríticas, o que permitiu análise mais consistente dos resultados.

A comparação das frequências das partições foi efectuada com os testes de Qui-quadrado e Kruskal-Wallis (69,330), considerando como classes de frequência (1, n-1), (2, n-2), (3, n-3) ... (r, n-r). Demonstrou-se não haver diferenças significativas entre os grupos alcoolizados (6 e 18 meses) e os respectivos grupos controlos. Também não se detectaram variações significativas entre as frequências das partições do grupo de abstinência e do grupo controlo da mesma idade.

Os valores do parâmetro Q determinados em cada grupo foram muito próximos de zero. Tal facto tornou aconselhável a aplicação do modelo definido para os dois parâmetros Q e S (325-327) para se verificar se o ajuste entre a distribuição das frequências observadas e as teoricamente definidas se adaptaria melhor com um dos modelos de "crescimento" terminal (T) ou segmentar (S), ou com o modelo que engloba os dois parâmetros (2P).

O cálculo da máxima verosimilhança (MLL) para o modelo Q-S (325-327) (Fig.35) mostrou que no grupo controlo de 6 meses os valores de Q e S eram, respectivamente, de 0,06 e 1,20 (Fig. 35 A) e no grupo alcoolizado durante 6 meses de 0,08 e 1,05 (Fig.35 B). No respeitante aos grupos de 18 meses, no controlo os valores de Q e S eram de 0,09 e de 1,55, respectivamente (Fig.35 C), e no alcoolizado de 0,02 e 0,90 (Fig.35 D). No grupo de animais submetidos a abstinência os valores encontrados para aqueles parâmetros eram, respectivamente, 0,01 e 0,25 (Fig.35 E).

Como se verifica, em todos os grupos estudados os valores do parâmetro Q aproximavam-se muito de zero o que aponta para o ajuste destas populações dendríticas ao modelo de "crescimento" terminal (327,330); os valores de S positivos mostram que são os segmentos proximais da árvore dendrítica os que têm maior probabilidade de se ramificar (325-327).

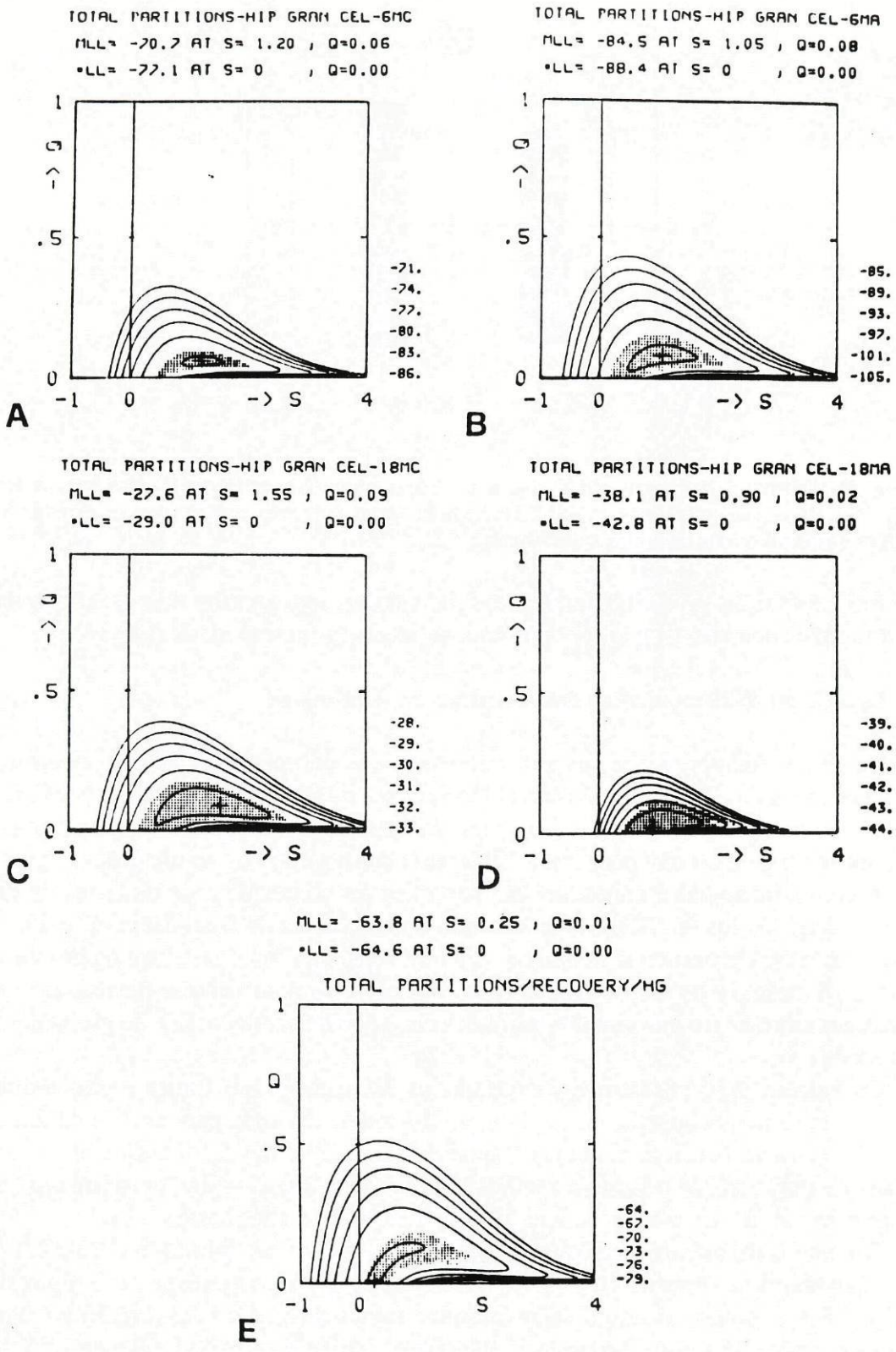


Fig. 35. Representação dos contornos das verosimilhanças do número total de partições das árvores dendríticas das células granulares dos grupos de animais de 6 meses controlo (A) e alcoolizado (B), de 18 meses controlo (C) e alcoolizado (D) e abstinente (E). A área pontuada indica todos os modelos que se ajustam à amostra. Os valores das verosimilhanças dos contornos (LL) estão representados no lado direito da figura e os das máximas verosimilhanças (MLL) indicados pela cruz.

Estes resultados estão explícitos nos gráficos dos contornos de verosimilhança das populações dendríticas estudadas (Fig.35).

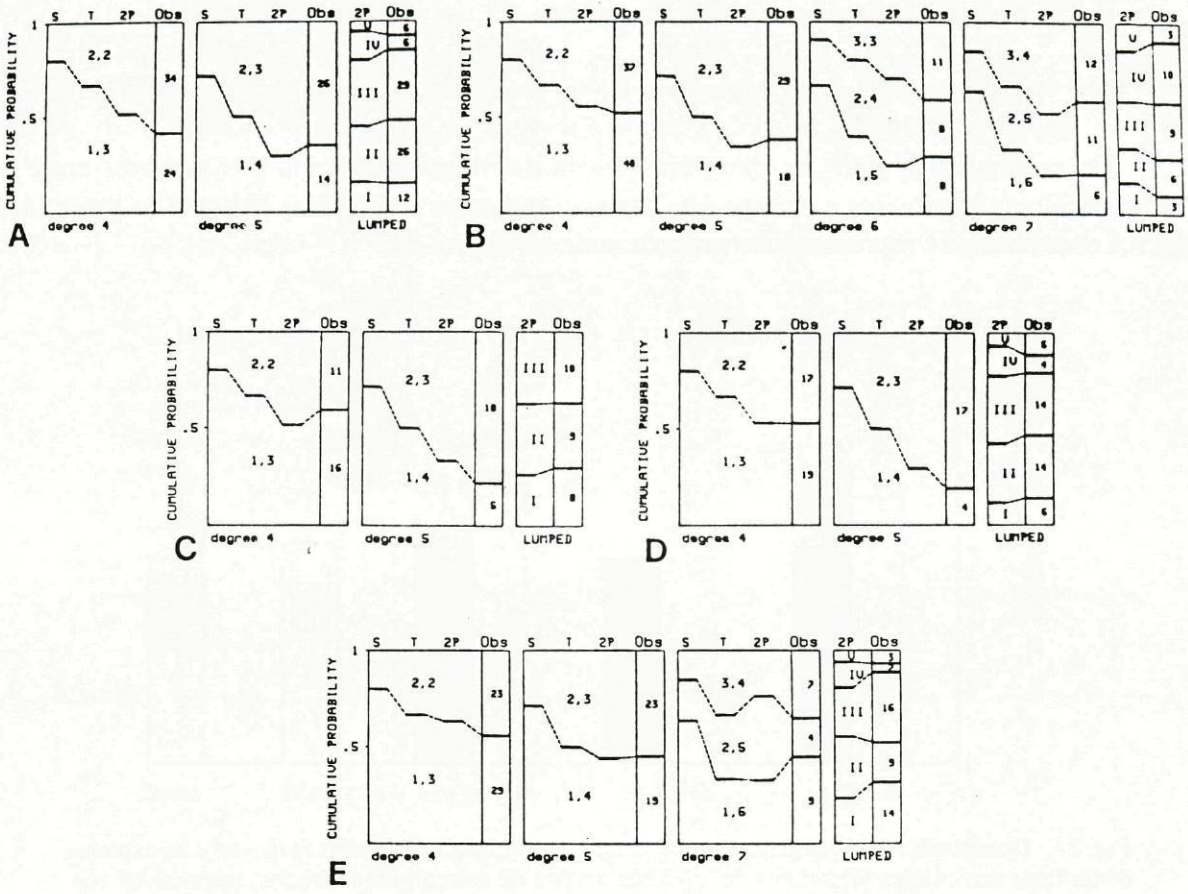


Fig. 36. Representação das probabilidades cumulativas das distribuições das partições de grau ≥ 4 das árvores filhas das arborizações dendríticas das células granulares dos grupos de animais de 6 meses controlo (A) e alcoolizado (B), de 18 meses controlo (C) e alcoolizado (D) e abstinente (E). As frequências calculadas para os modelos segmentar (S), terminal (T) e para dois parâmetros (2P) são comparadas com as frequências das partições obervadas na amostra (Obs). Os pares de números indicam as partições; nas agrupadas (*lumped*) as diferentes classes contêm as partições (r, n-r). O modelo 2P é o que apresenta sempre melhor correspondência com as observações.

A análise dos contornos das verosimilhanças representados na Figura 35 mostra, a pontuado, a extensão da área que inclui todas as frequências de partições das árvores estudadas que se ajustam ao modelo definido para os dois parâmetros com um grau de significância em que $p<0,05$. Pode constatar-se que é significativo o número de modelos aceitáveis para esta amostra. A sobreposição daquelas áreas no grupo alcoolizado e respectivo controlo mostra que os modelos são comuns às populações o que demonstra que, numa avaliação topológica, as populações analisadas não são basicamente diferentes.

Na Figura 36 representam-se as probabilidades cumulativas das frequências das partições de todos os grupos estudados; a sua análise demonstra que o modelo definido para os dois parâmetros (2P) é o que melhor se adapta às arborizações em estudo. Na verdade, verifica-se um maior ajustamento entre as frequências das partições teóricas calculadas para dois parâmetros e as encontradas nas árvores dendríticas estudadas; tal ajustamento não se verificava quando se relacionavam as frequências das arborizações estudadas com os modelos de "crescimento" para um parâmetro que respeitasse quer o tipo segmentar (S) quer o tipo terminal (T).

2.2.5. Estudos quantitativos ultrastruturais

2.2.5.1. Número de sinapses entre as fibras musgosas e as células piramidais de CA3

Os resultados obtidos na determinação da densidade numérica das sinapses entre os TFM das células granulares e as espinhas das excrescências dendríticas das células piramidais de CA3 encontram-se representados graficamente na Figura 37.

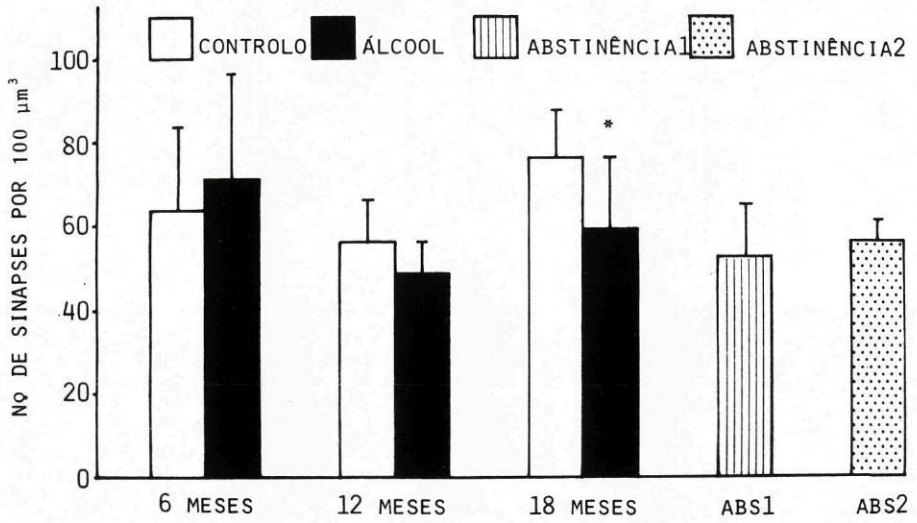


Fig. 37. Densidade numérica das sinapses entre os terminais das fibras musgosas e as espinhas dendríticas das células piramidais de CA3 nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * p<0,05; ABS2 vs 18M Controlo, p<0,01.

A análise dos valores apresentados mostrou que a densidade numérica destas sinapses não variava significativamente entre os grupos sujeitos a 6 e a 12 meses de alcoolização e os respectivos grupos controlos. No entanto, verificava-se redução significativa do N_v destas sinapses no grupo alcoolizado durante 18 meses quando se comparavam os seus resultados com os do grupo controlo da mesma idade. Os resultados da análise de variância encontram-se no Quadro 1.

No respeitante aos grupos de abstinência, os valores encontrados mostravam que unicamente o grupo de abstinência 2 apresentava redução significativa da densidade numérica das sinapses quando os valores eram comparados com o do respectivo grupo controlo da mesma idade. As comparações entre os resultados de ambos os grupos de abstinência com os dos grupos alcoolizados da mesma idade e com os dos grupos que ingeriram álcool durante o mesmo período de tempo não mostraram variações significativas (Fig.37).

2.2.5.2. Fracção da membrana dos terminais ocupada por zonas activas

Na Figura 38 encontram-se graficamente representados os resultados da determinação da fracção de plasmalema dos TFM ocupada por zonas activas. Verificou-se que nos três grupos alcoolizados os valores percentuais encontrados estavam significativamente aumentados em relação aos dos grupos de controlo da mesma idade. A análise de variância permitiu concluir que estes aumentos eram dependentes da ingestão de álcool e também do tempo de experiência (Quadro 1).

No respeitante aos grupos de abstinência, verificou-se que ambos apresentavam valores significativamente maiores que os dos controlos da mesma idade. A comparação do grupo de abstinência 1 com os grupos alcoolizados mostrou que não havia variações significativas quer

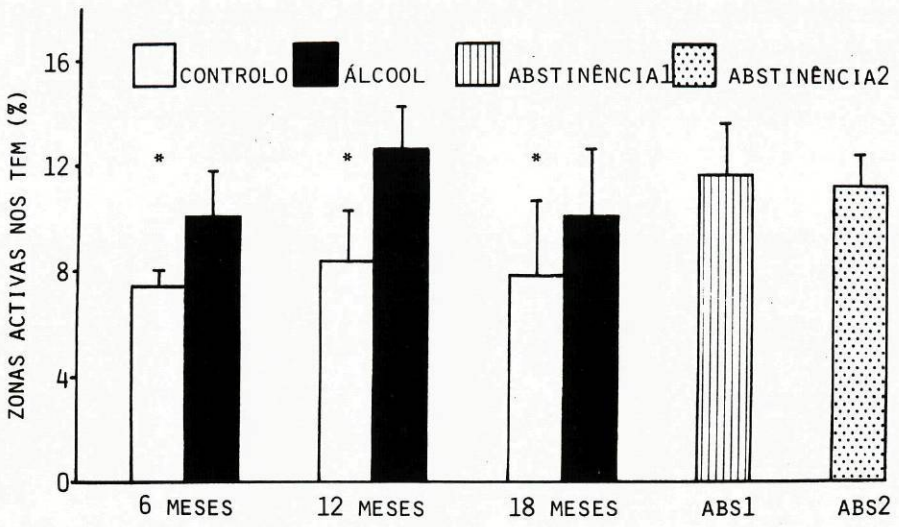


Fig. 38. Percentagem de plasmalema dos terminais das fibras musgosas ocupada por zonas activas nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * $p<0,05$. ABS1 vs 12M Controlo, $p<0,05$; ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,05$.

em relação ao grupo alcoolizado da mesma idade quer em relação ao que ingeriu etanol durante o mesmo período de tempo. No grupo de abstinência 2 o aumento encontrado era estatisticamente significativo quando comparado com os grupos controlo e alcoolizado da mesma idade (Fig.38).

2.2.5.3. Fracção volumétrica dos terminais das fibras musgosas

Os valores dos resultados obtidos no cálculo da densidade volumétrica dos TFM no neurópilo do estrato lúcido, encontram-se representados graficamente na Figura 39.

Verificou-se haver redução do V_v destes terminais nos grupos de animais alcoolizados em relação aos respectivos controlos; no entanto esta redução era unicamente significativa aos 6 e 12 meses de alcoolização. A análise de variância mostrou que as variações encontradas dependiam da ingestão do álcool e do tempo de experiência (Quadro 1).

No que aos grupos de abstinência dizia respeito, os valores encontrados não diferiam

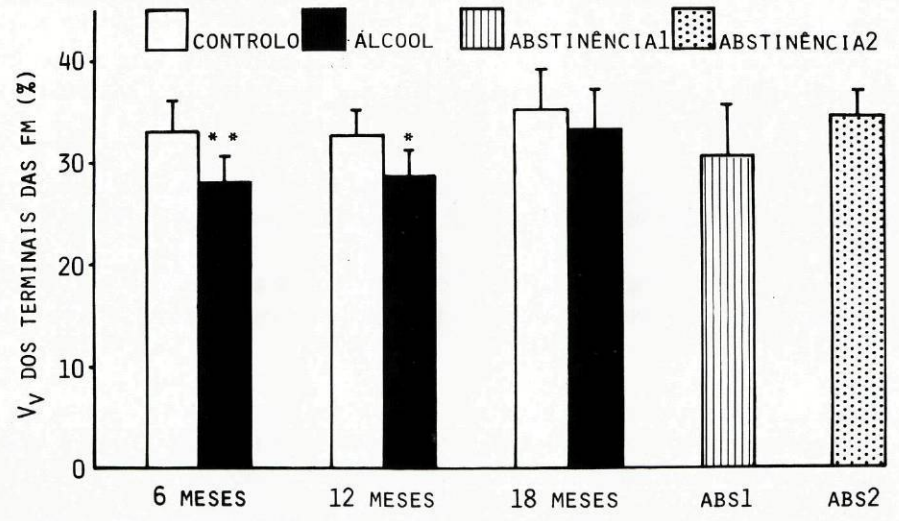


Fig. 39. Densidade volumétrica dos terminais das fibras musgosas do estrato lúcido nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

significativamente dos obtidos nos grupos alcoolizado e controlo da mesma idade e no que ingeriu etanol durante igual período de tempo (Fig.39).

3. CÓRTEX PRELÍMBICO

3.1. Observações qualitativas

3.1.1. Microscopia de luz

3.1.1.1. Cortes semifinos

A observação microscópica dos cortes semifinos da área prelímbica (PL) permitiu a visualização das cinco camadas corticais existentes nesta região do córtex prefrontal medial (CPFm), característica comum a todo o córtex prefrontal (CPF) do Rato (157,246,320,321) e de outros roedores (157,246), bem como de outros mamíferos não primatas (246,252,287), onde não existe a camada IV.

Adoptou-se a nomenclatura de Krettek e Price (157) que definiram o CPFm do Rato adulto como a porção cortical da superfície medial do hemisfério cerebral situada rostralmente em relação ao córtex retrosplénico e nela consideraram quatro áreas principais, citoarquitectonicamente distintas: precentral medial (PCm), cingulada anterior (CA), prelímbica (PL) e infralímbica (IF); dividiram ainda a área cingulada anterior em dorsal (CAd) e ventral (CAv) (Fig.5 A,B).

Na área PL (Fig.40) observou-se laminação cortical bastante nítida, menos marcada nas restantes áreas do CPFm do Rato (157,321). À camada I, que possuía características citoarquitectónicas idênticas às descritas em qualquer outra área cortical (232,275) e era mais espessa que a homónima da área CAd (321), seguia-se a camada II onde se observavam perfis de neurónios com pericários volumosos, densamente agrupados e intensamente corados e que não penetravam na camada I; esta última característica facilitou a distinção entre as áreas PL e IF (321). A camada III, facilmente individualizável da camada precedente, apresentava espessura

---

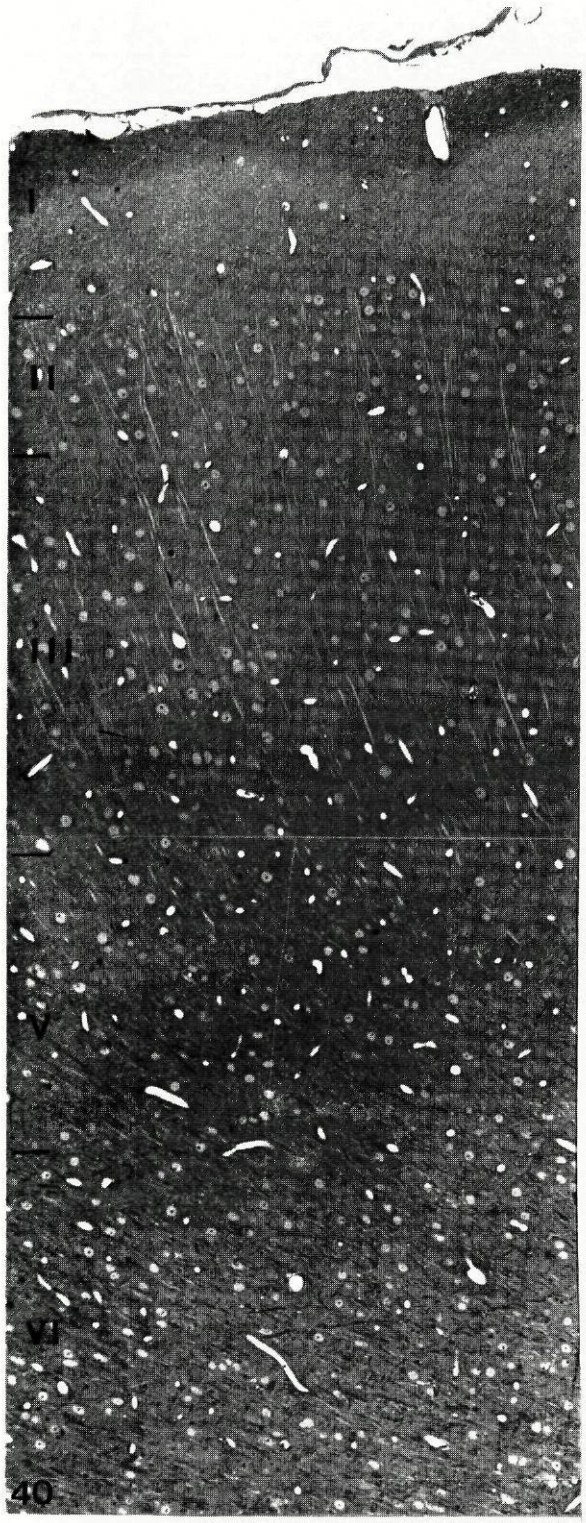
Fig. 40. Montagem fotográfica de um corte semifino da área prelímbica do córtex prefrontal medial mostrando as cinco camadas corticais existentes neste tipo de córtex. Controlo de 18 meses. Azul de toluidina. 130 X.

Fig. 41. Córtex prelímbico impregnado pelo método de Golgi. Observam-se células piramidais típicas situadas a níveis diferentes da camada III. 6 meses de alcoolização. 60 X.

Fig. 42. Fotomontagem de uma célula piramidal típica da parte alta da camada III do córtex prelímbico, impregnada pelo método de Golgi. Identifica-se o seu axónio (seta). 18 meses de alcoolização. 240 X.

Fig. 43. Porção de dendrito secundário da arborização basal de uma célula piramidal típica da camada III do córtex prelímbico, impregnada pelo método de Golgi. Note-se a presença de numerosas espinhas de morfologia variável. Controlo de 18 meses. 1.660 X.

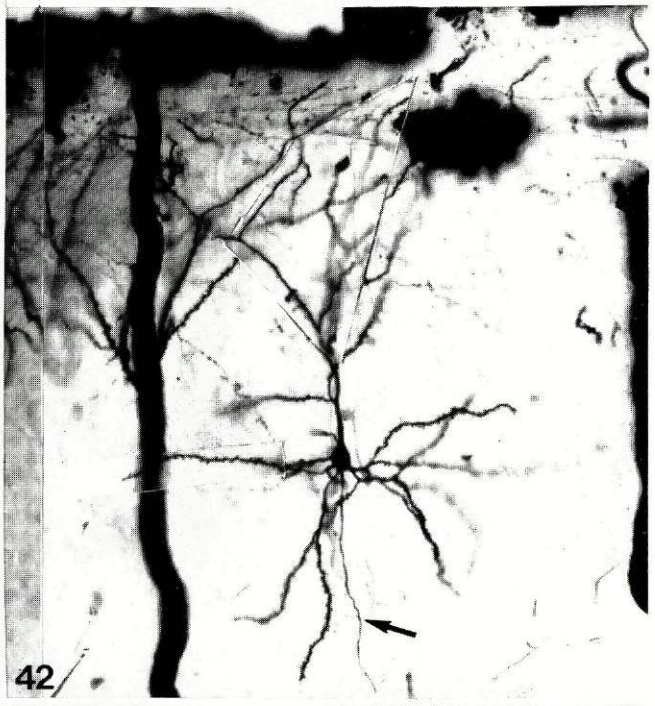
Fig. 44. Arborização basal de uma célula piramidal típica da camada III do córtex prelímbico. É visível uma porção do axónio (setas). Abstinência 2. 400 X.



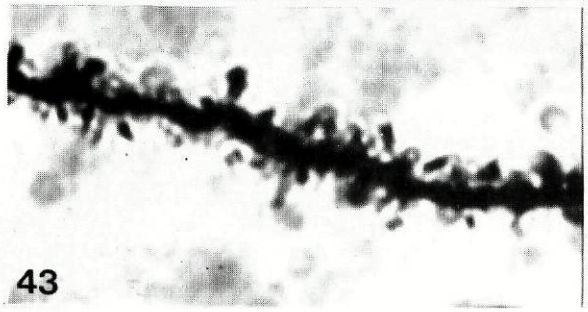
40



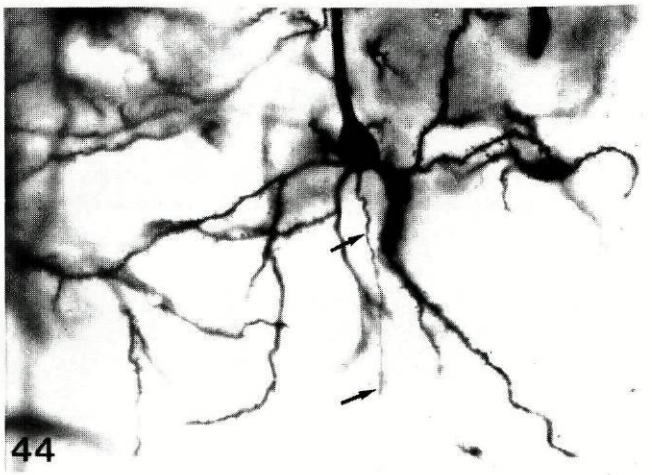
41



42



43



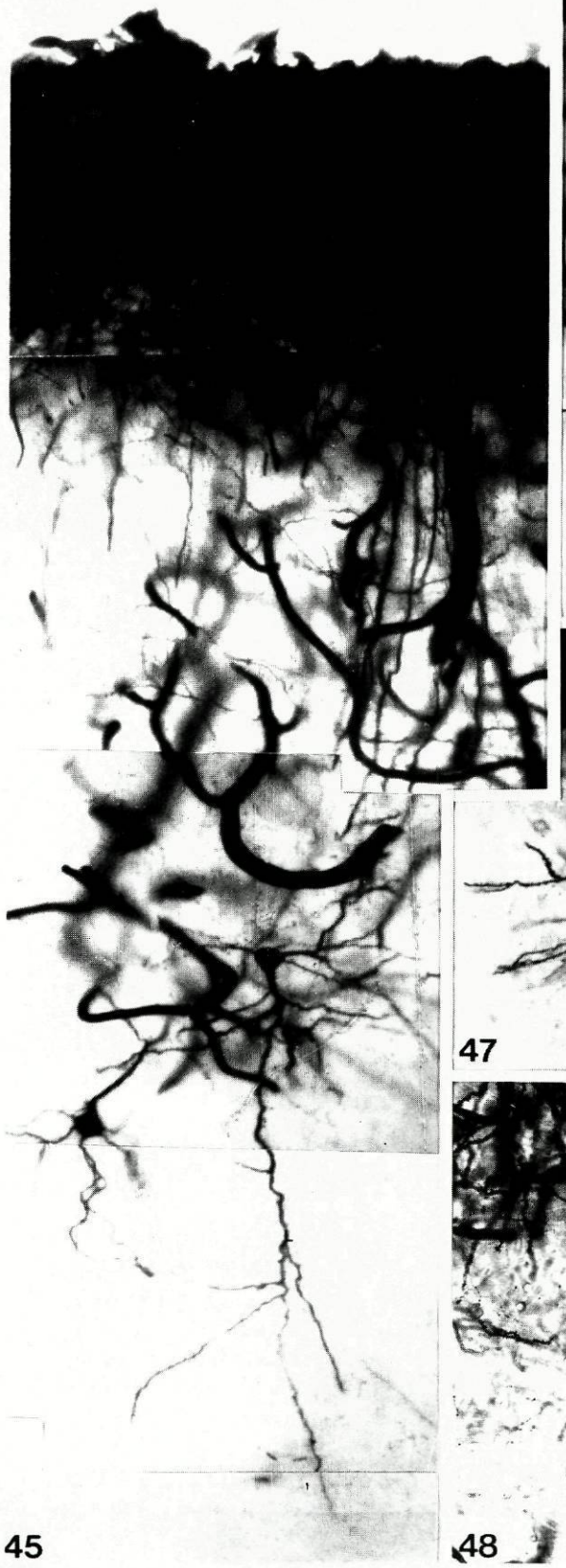
44

Fig. 45. Fotomontagem de uma célula piramidal invertida, localízada na parte profunda da camada III do córtex prelímbico, impregnada pelo método de Golgi. Controlo de 6 meses. 240 X.

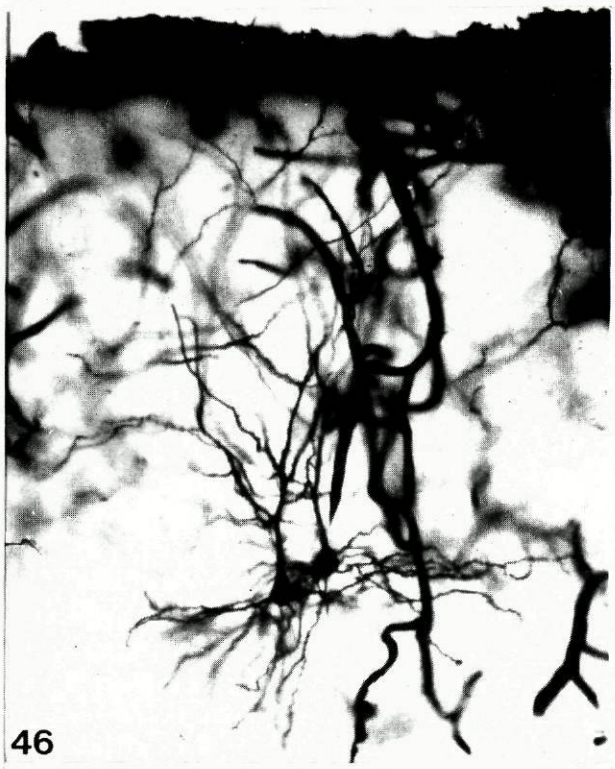
Fig. 46. Células piramidais da camada III do córtex prelímbico impregnadas pelo método de Golgi. As características da pirâmide situada à esquerda permitem defini-la como uma célula piramidal modificada. Controlo de 18 meses. 240 X.

Fig. 47. Célula piramidal atípica da camada III do córtex prelímbico, impregnada pelo método de Golgi, que apresenta as características das células piramidais horizontalmente dispostas.Controlo de 18 meses. 240 X.

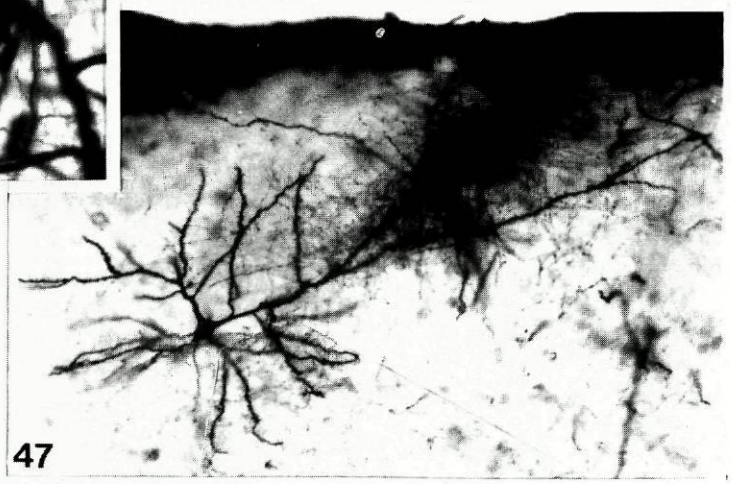
Fig. 48. Célula multipolar da porção mais superficial da camada III do córtex prelímbico, impregnada pelo método de Golgi. É notória a menor densidade e a maior dimensão das suas espinhas (setas). Controlo de 6 meses. 230 X.



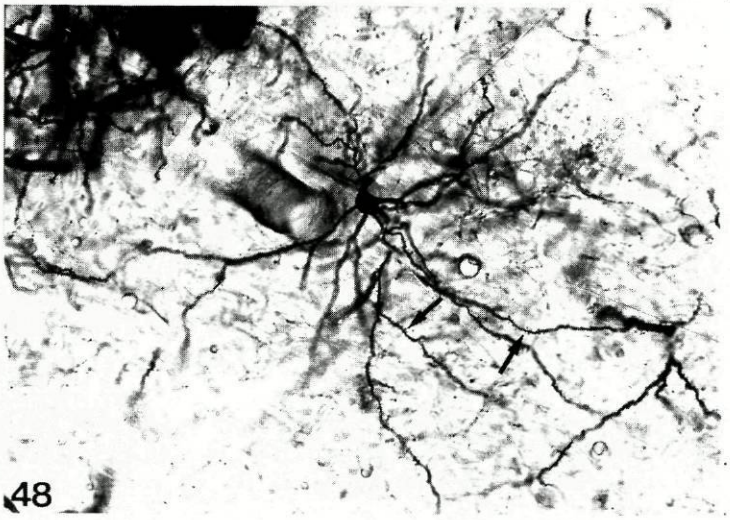
45



46



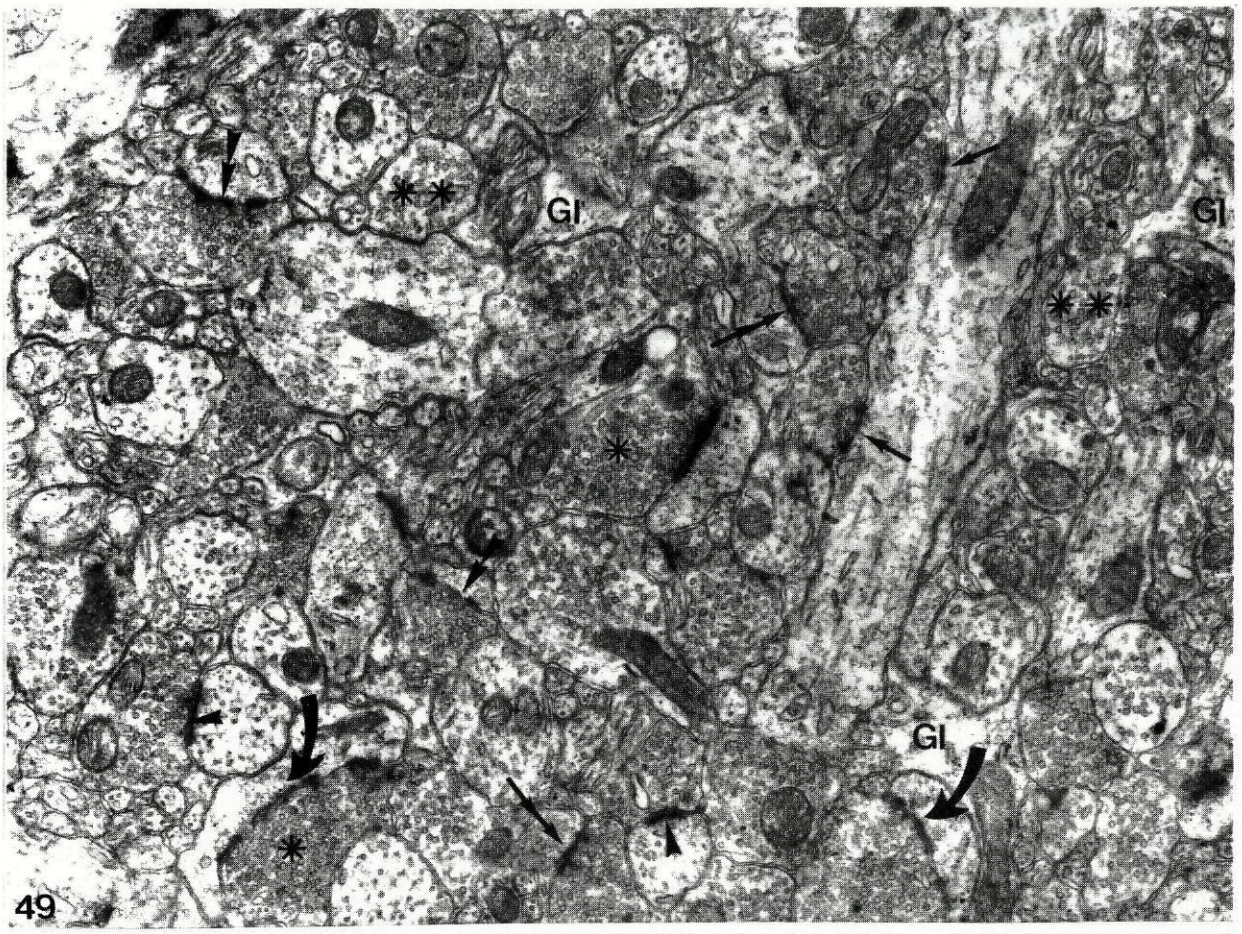
47



48

Fig. 49. Neurópilo da camada III do córtex prelímbico. São visualizáveis terminais com vesículas densamente agrupadas (asteriscos) e outros com vesículas mais dispersas (duplos asteriscos). Observam-se contactos sinápticos axodendríticos (setas) e axospinhosos (duplas setas). Além dos perfis sinápticos de características comuns (pontas de seta), são visíveis contactos sinápticos perfurados simples (duplas pontas de seta) e múltiplos (setas curvas). Além da presença de perfis dendríticos nota-se também a de prolongamentos gliais (Gl). 12 meses de alcoolização. 20.000 X.

Fig. 50. Sinapse perfurada do neurópilo da camada III do córtex prelímbico na qual o aspecto da espícula (seta) entre as zonas activas do contacto varia conforme a angulação de fotografia do corte. 18 meses de alcoolização. 60.000 X.


Gl
Gl
Gl
49

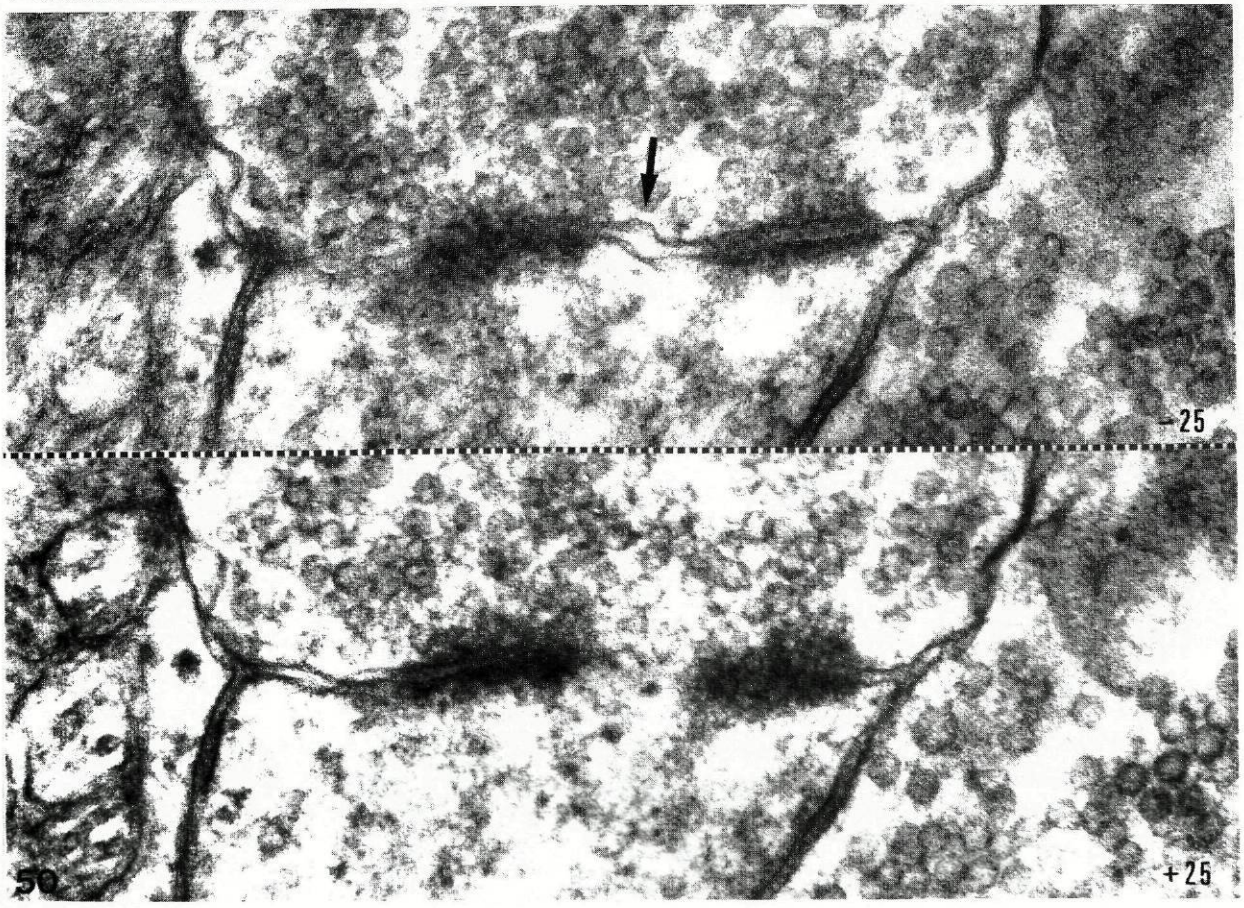
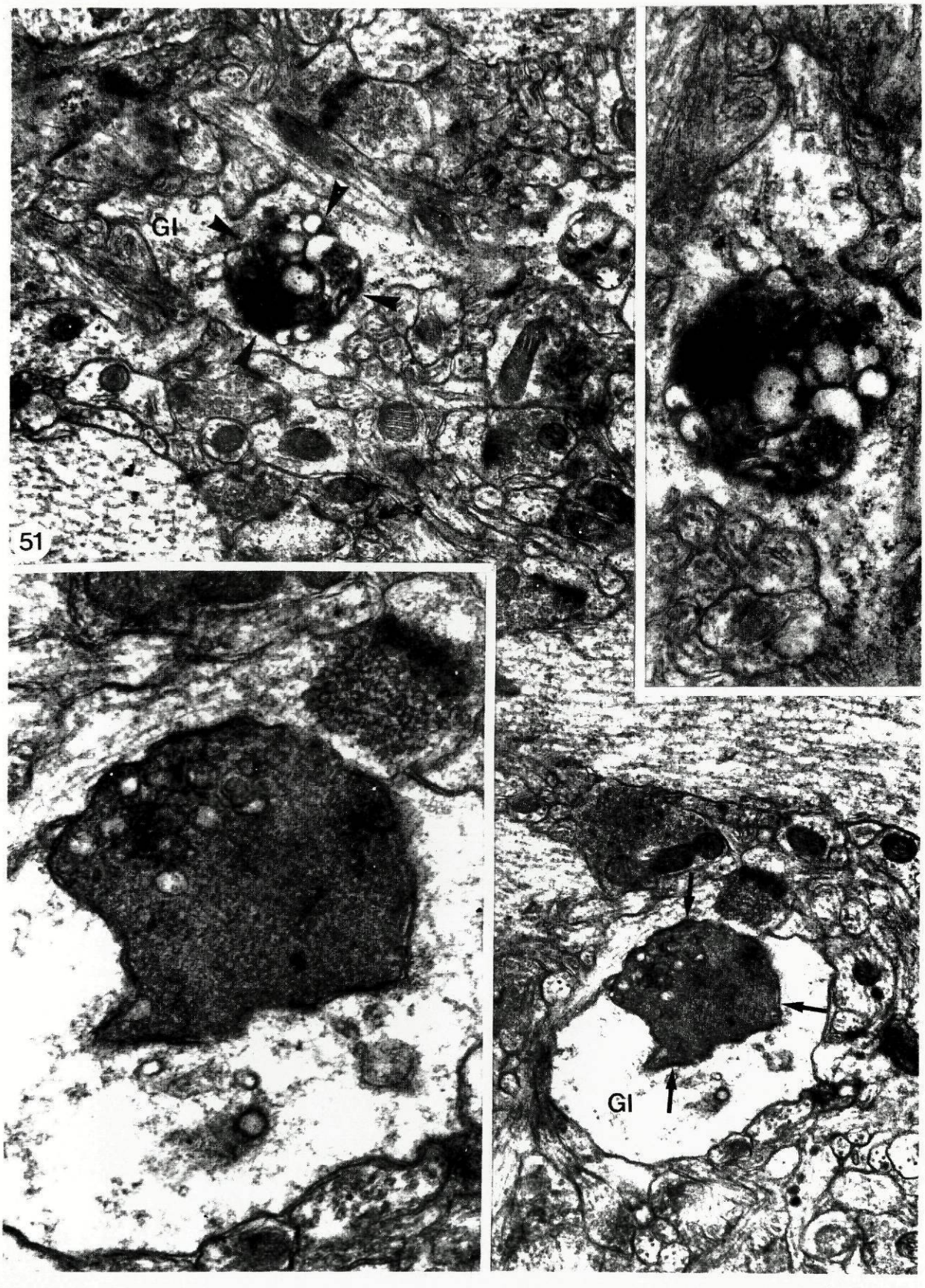

-25
+25
50

Fig. 51. Neurópilo da camada III do córtex prelímbico. No ângulo superior esquerdo observa-se um terminal degenerado (pontas de seta) envolvido por um prolongamento glial (Gl) e no qual são ainda visíveis vesículas sinápticas. No ângulo inferior direito observa-se também um prolongamento glial (Gl) a envolver um perfil degenerado (setas), provavelmente de um dendrito. 12 meses de alcoolização. 24.000 X. Inseridos - Maiores ampliações dos perfis degenerados. 41.000 X.


GI
51
GI

não inferior ao somatório das espessuras das camadas I e II e mostrava perfis celulares de menor diâmetro, menos densamente agrupados e não tão intensamente corados que os da camada II. A camada V não era separada da camada III por uma lâmina pobre em células, ao contrário do que se notou nas restantes áreas do CPFm (321); no entanto, as características dos seus neurónios, que apresentavam perfil arredondado e diâmetro relativamente grande (157,252,321) embora menor que o das células piramidais da camada neocortical correspondente (232,275,321), permitiram estabelecer a distinção entre as duas camadas. Não se conseguiram diferenciar nesta camada V, tal como na VI, as três subcamadas descritas por Van Eden e Uylings (321) em cortes de 35 a 40 μm de material incluído em celoidina e corado pelo violeta de cresil. A camada VI, de espessura decrescente à medida que se caminhava em direcção caudal, apresentava neurónios de tamanho variável embora geralmente menor que os da camada V que, além disso, coravam mais intensamente (157); somente estas diferenças permitiram, a maior parte das vezes, distinguir a transição entre estas duas camadas mais profundas.

De modo geral não se notaram grandes alterações na distribuição dos neurónios e na organização laminar da área PL no decurso dos diferentes períodos experimentais. Tendo-se dedicado especial atenção à observação da camada III, visualizou-se aumento progressivo da deposição citoplasmática de grãos de lipofuscina em muitas das suas células, à medida que se prolongavam os períodos experimentais. Esta deposição era mais evidente nos animais submetidos a alcoolização, seguida ou não de abstinência, tal como acontece noutras áreas do SNC (36,49,294,303).

3.1.1.2. Método de Golgi

A observação dos cortes coronais do CPF impregnados pelo método de Golgi-Stensaas (279) foi feita nas camadas I-III da área PL dos animais de todos os grupos estudados (Fig.41). O córtex PL foi referenciado, na superfície medial dos cortes, pela sua situação imediatamente acima da fissura rinal da superfície lateral do corte (Fig.5 A,B).

Utilizou-se a classificação de Peters e Jones (229) na caracterização e agrupamento dos neurónios da camada III que apresentavam impregnação de qualidade suficientemente boa para permitir a sua análise correcta. Tal classificação (229) baseia-se na divisão dos neurónios corticais em piramidais e não piramidais, incluindo neste último grupo as células multipolares, as bitufosas e as bipolares, de acordo com o padrão de distribuição das suas arborizações dendríticas (101).

Entre os neurónios destes diferentes tipos *, os que mais frequentemente se observaram foram as células piramidais típicas (232) (Figs.41, 42) cujas características morfológicas eram coincidentes com as das pirâmides desta e doutras camadas descritas noutras áreas corticais (100,229,231,232,276). Com somas situados a diferentes níveis da camada III, mostravam um corpo com dimensões variáveis e de forma nem sempre tipicamente triangular ou cónica, pois observaram-se pericários de configuração esférica, ovóide e periforme. A surgir do polo superior do corpo celular via-se o seu dendrito apical, mais longo e de maior diâmetro que os res-

* A descrição morfológica dos diferentes neurónios observados na camada III do córtex prelímbico, em material impregnado pela prata, que se apresenta neste estudo é um pouco exaustiva para se enquadrar num trabalho desta índole cujo objectivo é fundamentalmente o estudo quantitativo dos efeitos da alcoolização e da abstinência sobre a estrutura de duas áreas do SNC. Contudo, o facto de na literatura existir somente um trabalho que aborda superficialmente o estudo morfológico desta área cortical no Rato empregando o método de Golgi (336), supõe-se justificada a opção tomada.

tantes, a ascender verticalmente até à camada II, onde se dividia em ramos terminais que atingiam a camada I seguindo trajectos mais ou menos oblíquos (Fig.42). Do tronco do dendrito apical, e como neste tipo de neurónios usualmente se verifica (100,229,231,232,276,336), partia um número reduzido de ramificações secundárias que se dividiam e, tal como os dendritos terminais, também se dirigiam à superfície pial. De forma constante, verificou-se que, até próximo da origem dos primeiros dendritos secundários, o dendrito apical não apresentava espinhas; mais distalmente, o seu aspecto tornava-se diferente já que, tal como nos dendritos secundários e suas ramificações, a presença de numerosas espinhas, de forma e características variadas (230,231,336), lhe conferiam contorno mais irregular (Fig.43). Nestas pirâmides observou-se que de pontos diferentes da base do corpo celular surgia um segundo grupo de dendritos que regra geral sucessivamente se ramificavam dicotomicamente formando no conjunto uma extensa arborização basal que se espraiava em plena camada III (Figs.42, 44). Tal como no dendrito apical, também as porções proximais destes dendritos basais se mostravam desprovidas de espinhas, que existiam em grande número nas ramificações que se lhes seguiam.

Os neurónios piramidais em estudo apresentavam um axónio muitas vezes identificável ao longo de extensões consideráveis (Figs.42, 44), penetrando francamente nas camadas corticais subjacentes, havendo casos em que era possível ser seguido até à substância branca; contudo, na maioria das células somente a sua porção proximal se visualizava. Geralmente nascendo da base do pericário, em local oposto à emergência do dendrito apical, e seguindo trajecto vertical ou ligeiramente oblíquo, apresentava aspecto fino e tortuoso, de contornos lisos (100); em algumas pirâmides o axónio surgia dum dos dendritos primários da arborização basilar.

Além destas pirâmides típicas, observaram-se células piramidais atípicas (Figs.45, 46, 47). Viram-se com frequência células piramidais cujos dendritos apicais se bifurcavam em plena camada III e cujos ramos terminais não atingiam a camada cortical mais superficial, distribuindo-se pela parte alta da camada III e na camada II (Fig.46). Este tipo de células piramidais atípicas corresponde ao designado por Peters e Kara (232) como pirâmides modificadas. Mais raramente observaram-se ainda pirâmides horizontalmente dispostas semelhantes às descritas nas camadas II-III do córtex visual do Rato por aqueles mesmos autores (232) (Fig.47); tais neurónios em tudo se mostravam idênticos às pirâmides típicas mas dispunham-se horizontalmente de modo que o dendrito apical se estendia paralelamente à superfície pial. Muito mais raramente observaram-se pirâmides invertidas (100,232,275,336) que igualmente diferiam das células piramidais típicas pela sua orientação na camada III (Fig.45); os seus dendritos apicais orientavam-se em direcção às camadas profundas e a sua arborização basilar ocupava posição invertida. Nestas células o axónio, partido da base do pericário, mostrava de imediato tendência a encurvar-se em direcção à profundidade do córtex. Tanto quanto se sabe, neurónios deste tipo foram descritos por Vogt e Peters (336) nas camadas V e VI da área prelímbica do Rato, do mesmo modo que Feldman (100) os descreveu nas mesmas camadas do córtex visual e Sousa-Pinto (275) no córtex auditivo principal do Gato.

As células não piramidais (98,229), que muito resumidamente se descrevem pois não se incluem no âmbito deste estudo, eram frequentes na camada III da área PL da maioria dos animais estudados. As células multipolares (Fig.48), menos frequentemente observadas que as células piramidais, situavam-se preferencialmente na porção mais superficial da camada III. A sua morfologia não variava em relação às descrições de outros autores feitas nesta (336) e noutras áreas corticais (98,229,233,275). Embora na maioria dos neurónios observados o soma celular apresentasse configuração poligonal, em alguns a sua forma aproximava-se da esférica. Deste pericário irradiavam, em todas as direcções, dendritos primários de calibre idêntico e que precocemente se dividiam sucessivamente para constituir uma arborização que se estendia pelas camadas III e II, na qual se visualizavam escassas espinhas cuja distribuição e forma con-

trastavam com as das células piramidais. Com frequência se viram axónios impregnados, com trajectos sinuosos, mas nunca formando plexos pericelulares como acontece com a maioria dos interneurónios (98,229,233,336).

Na camada III do córtex PL não se observaram os outros tipos de neurónios não piramidais (bitufosos e bipolares) ao contrário do descrito por Vogt e Peters (336) nesta mesma área. Registe-se, porém, que se observaram algumas células bitufosas na área CAd.

A observação qualitativa do material impregnado pela prata não permitiu verificar qualquer alteração morfológica das células da camada III do córtex PL entre os animais submetidos a alcoolização, seguida ou não de abstinência, e os animais testemunha.

3.1.2. Microscopia electrónica

3.1.2.1. Organização estrutural do neurópilo da camada III

O aspecto ultrastrutural do neurópilo da camada III do córtex da área PL mostrava-se semelhante ao descrito em outras áreas corticais (235). Era um neurópilo de estrutura complexa. Chamava a atenção a abundância de perfis de terminais de configuração variável que apresentavam área média de $0{,}438 \pm 0{,}014$ μm^2 e eram preenchidos por vesículas sinápticas (Fig. 49); a maior parte das vezes continham mais que um perfil mitocondrial e microtúbulos.

Distinguiam-se dois tipos de terminais (Fig. 49). O mais frequente continha numerosas vesículas sinápticas de forma arredondada e agranulares, agrupadas de forma tão densa que às vezes dificultavam a visualização da matriz. No outro tipo de terminal as vesículas, também de forma esférica, eram, porém, em muito menor número e dispersas em matriz pouco densa. Nestes terminais, e ao contrário do que acontecia com o tipo anterior, distinguia-se facilmente a acumulação de vesículas junto da densidade pré-sináptica; eram frequentes nestes terminais vesículas granulares (235) de maiores dimensões (Fig. 49). Os terminais de qualquer um dos tipos descritos estabeleciam sinapses assimétricas (65) ou tipo I de Gray (123) com dendritos ou suas espinhas (Fig. 49).

Foram também observados abundantes dendritos dispondo-se nas mais diferentes orientações nos quais, além da presença de perfis mitocondriais, de cisternas de retículo endoplásmico liso e de ribosomas livres, era de assinalar a existência de rica rede microtubular. Estes dendritos pertenciam não só a neurónios situados na camada III como a células com somas localizados nas camadas vizinhas e que atravessavam o neurópilo em questão. Nos perfis de maiores dimensões frequentemente se constatou a presença de corpos multivesiculares gigantes. Encontraram-se, além disso, numerosos perfis de espinhas dendríticas; quando a sua emergência do tronco dendrítico era visualizável, distinguiam-se espinhas pediculadas e sésseis.

Observaram-se perfis de axónios mielinizados com os característicos microtúbulos e mitocôndrias no seu interior e ainda, mais frequentemente, perfis de axónios não mielinizados, às vezes formando conjuntos de três ou mais fibras.

Identificaram-se também perfis de prolongamentos gliais, de extensão variável, insinuando-se entre os componentes do neurópilo descritos.

A maioria dos contactos sinápticos observados verificava-se com dendritos, quer com os seus troncos (sinapses axodendríticas) quer com espinhas (sinapses axospinhosas) (Fig. 49). Em muitas das junções axospinhosas, que eram as nitidamente predominantes nesta camada cortical, era bem visível, no componente pós-sináptico, um aparelho de espinha (124,235,289).

Os perfis sinápticos apresentavam extensão variável. Ao lado de formas simples comuns no córtex cerebral (58,230,235), observaram-se formas mais complexas de contactos sinápticos (93,202); alguns destes apresentavam-se aparentemente fenestrados dado serem visíveis soluções de continuidade através das densidades paramembranosas e respectivas membranas (50,81,117) (Figs. 49, 50). Estas sinapses, designadas de perfuradas por Peters e Kaiserman-Abramof (230), eram simples ou múltiplas. No primeiro caso, a densidade pós-sináptica estava dividida por pequena zona não especializada da membrana (58,93,230), enquanto no segundo observavam-se três ou mais porções daquela densidade separadas entre si (Figs. 49, 50). De salientar ainda que só as densidades pós-sinápticas mais extensas apresentavam perfurações, observação que, aliás, está de acordo com o referido por outros autores (58,230). Frequentemente verificou-se que um único terminal estabelecia sinapses com dois ou três perfis dendríticos; esta situação ocorria com qualquer dos tipos de contacto descritos.

A organização estrutural do neurópilo que se acaba de descrever para os animais testemunha de todas as idades mostrava-se pouco modificada nos animais dos grupos submetidos a alcoolização, seguida ou não de abstinência.

A presença simultânea de sinais de degenerescência e de reorganização neuronais era evidente nos animais dos grupos de 6 e 12 meses de alcoolização, mas nunca de forma exuberante. De registar até que nos grupos submetidos a alcoolização durante 18 meses, ao contrário do que seria de esperar tendo em conta o que acontece em outras áreas do SNC (290,301), e nos grupos de abstinência, o neurópilo mantinha organização praticamente idêntica à descrita nos grupos controlos.

Os fenómenos degenerativos eram visíveis quer em botões axonais quer em dendritos, embora de modo mais evidente nos primeiros (Fig. 51). Observaram-se botões em estádios diferentes de degenerescência, sempre do tipo denso (18,20,59,122,222,247): matriz densa com vesículas dispostas de forma mais compacta e às vezes deformadas, mitocôndrias muitas vezes com aspecto modificado e microtúbulos ainda em quantidade apreciável, sendo em muitos casos possível individualizar contactos sinápticos com os alvos pós-sinápticos. Porém, em fases mais adiantadas de degenerescência, o conteúdo dos terminais apresentava matriz electronicamente muito densa onde quer as vesículas quer as mitocôndrias e os microtúbulos eram dificilmente perceptíveis; mesmo nestas circunstâncias, eram frequentemente identificáveis contactos sinápticos axospinhosos ou axodendríticos que permitiram considerá-los terminais nervosos.

O grau de envolvimento glial nos processos degenerativos descritos era variável (Fig. 51); parecia, porém, ser mais marcado quanto mais avançado fosse o estádio de degenerescência; traduzia-se por envolvimento da estrutura degenerada por prolongamentos gliais onde, muito frequentemente, se vislumbravam quantidades variáveis de glicogénio (Fig. 51).

Também se notou degenerescência dendrítica no neurópilo desta camada do córtex prelímbico nos animais submetidos a 6 e 12 meses de alcoolização, às vezes em áreas muito próximas daquelas em que se observavam terminais degenerados (Fig. 51). Os sinais degenerativos encontrados, também do tipo denso (222, 223), tinham características diferentes conforme o grau de evolução. Nas fases mais precoces, em que se reconheciam ainda os contactos sinápticos à superfície dendrítica, havia densificação da matriz com mitocôndrias agrupadas mostrando alterações estruturais evidentes. Também aqui os perfis dendríticos encontrados eram envolvidos, em grau variável, por prolongamentos gliais (Figs. 49, 51). Note-se que se visualizavam perfis dendríticos com aspectos distróficos sendo, nestes casos, impossível identificar os seus organitos com excepção para os microtúbulos; mesmo nestes casos eram visíveis con-

tactos sinápticos que permitiam a sua identificação. Foram ainda encontrados inúmeros perfis degenerados nos quais de tal forma estava alterada a estrutura que era impossível a sua classificação como prolongamentos dendríticos ou como terminais axonais; nestes casos eram mais abundantes estruturas do tipo corpos densos distribuídas irregularmente em matriz de alta densidade electrónica.

Para além destes perfis densos, outros havia em que, dado o seu avançado estádio de degenerescência, também não era identificável a sua proveniência dendrítica ou axonal e que se rotularam de neuritos distróficos, caracterizados por grande complexidade morfológica dos seus *debris* membranosos e onde se viam acumulações de corpos densos e lamelares e perfis tubulovesiculares (216).

A reacção glial que acompanhava este tipo de degenerescência era do mesmo tipo da descrita para os perfis axonais.

Em todos os grupos alcoolizados e de abstinência se observaram arranjos membranosos peri-axonais que, embora inespecíficos, levaram a pensar, pela sua disposição, poder tratar-se de fenómenos de dismielinização (243).

A par destes sinais indicadores de fenómenos degenerativos, observavam-se algumas imagens que demonstravam certo grau de actividade reorganizativa deste neurópilo. De facto, e mais marcadamente aos 12 que aos 6 e aos 18 meses de alcoolização e que nos grupos de abstinência, constatou-se a presença de secções de dendritos que continham perfis mitocondriais alongados, electronicamente bastante densos e dispostos de forma muito compacta, idênticos aos observados nos "cones de crescimento" (235,362).

No que respeita às sinapses, a simples análise qualitativa deixava antever a presença de aumento do número de perfis sinápticos complexos, perfurados simples ou múltiplos (58,93, 230), nos animais alcoolizados e nos submetidos a abstinência. Em muitas das sinapses perfuradas, a parte correspondente à zona desprovida de densidades sub-sinápticas não apresentava o típico material denso na fenda sináptica (Figs. 49, 50). Nestes casos, os aglomerados de vesículas concentravam-se junto das densidades pré-sinápticas ficando o citoplasma do terminal, junto da perfuração, com número muito mais reduzido de organitos. Também frequentemente se verificava, nos animais alcoolizados e nos dos grupos de abstinência, que muitos perfis sinápticos complexos formavam espículas (288,289) a partir das porções de ambas as membranas pré- e pós-sináptica situadas entre as zonas activas e que apresentavam aspectos diferentes de acordo com o plano da secção, conforme foi demonstrado pelo seu estudo após angulação (*tilting*) dos respectivos cortes (Fig. 50), realizado pelo Prof. E. G. Gray no *University College London.*

3.2. Estudos quantitativos

3.2.1. Espessura das camadas corticais I-III

Os resultados da determinação da espessura das camadas corticais I-III da área prelímbica nos animais de todos os grupos estudados encontram-se representados na Figura 52. Embora se revestisse de particular interesse a espessura da camada III, no início do trabalho pretendia-se avaliar a espessura total das três camadas pois poderia fornecer indicações sobre alterações das arborizações apicais das pirâmides da camada III. Verificou-se mais tarde, pelo estudo do material impregnado pela prata, não ser possível a avaliação quantitativa dos dendritos daquelas arborizações. Contudo, medições realizadas separadamente nas camadas I-II e na camada III em 4 grupos de animais (2 controlos e 2 alcoolizados) mostraram que as reduções

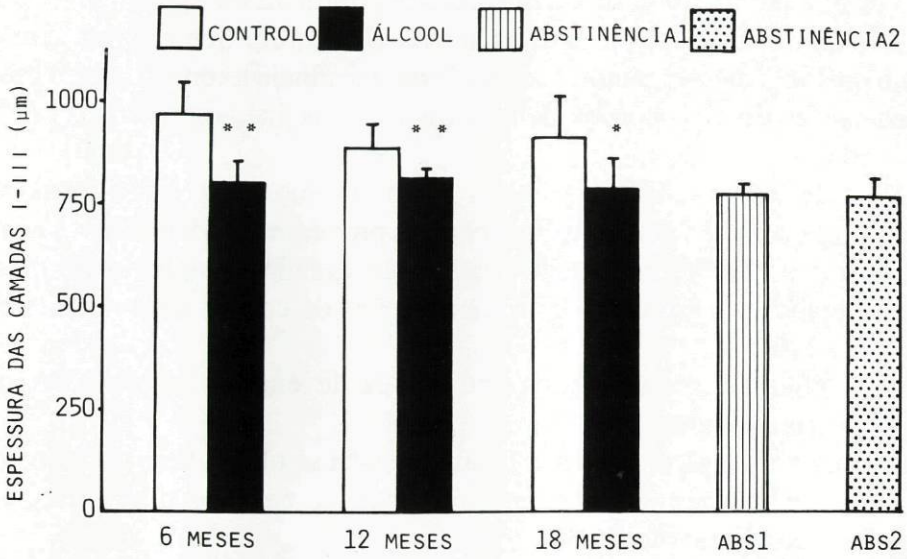


Fig. 52. Espessura das camadas I-III do córtex prelímbico nos animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. ABS1 vs 12M Controlo, $p<0,01$; ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$.

verificadas eram da responsabilidade de variações da espessura da camada III.

A análise dos resultados mostrou haver redução significativa dos valores daquela espessura nos animais alcoolizados a partir dos 6 meses de experiência, quando comparados com os respectivos controlos. A análise de variância destes resultados, considerando como factores a duração do tempo de experiência e a ingestão de álcool, permitiu demonstrar que as diferenças encontradas eram somente dependentes do factor álcool (Quadro 3).

No respeitante aos grupos de animais sujeitos a abstinência, verificou-se que a espessura das camadas corticais se mostrava significativamente reduzida em relação aos controlos da mesma idade; não se encontraram diferenças significativas nos valores da referida espessura de cada um dos grupos de abstinência quando comparados com os grupos alcoolizados da mesma idade ou com os grupos em que o período de ingestão de álcool foi igual ao período de ingestão dos grupos de abstinência (6 e 12 meses de alcoolização) (Fig. 52).

3.2.2. Densidade numérica das células piramidais da camada III

Os valores das densidades numéricas das células piramidais da camada III do córtex da área PL encontram-se representados na Figura 53.

Pode verificar-se redução do número de células por unidade de volume em todos os grupos alcoolizados, quando se comparavam os resultados com os obtidos nos controlos da mesma idade; contudo, somente a partir dos 12 meses de alcoolização tal diminuição era significativa. A análise de variância destes resultados permitiu concluir que a diminuição do N_v destas células era dependente dos factores ingestão de álcool e tempo de experiência (Quadro 3).

Em relação aos grupos de abstinência verificou-se que ambos apresentavam diminuição significativa da densidade numérica destas células quando os resultados obtidos eram comparados com os controlos da mesma idade. Contudo, se no grupo de abstinência 1 o N_v não variava significativamente quando comparado com o do grupo alcoolizado durante o mesmo período de tempo, já se mostrava significativamente aumentado se comparado com o grupo que ingeriu

QUADRO 3

Resultados da aplicação da ANOVA para dois factores aos dados quantitativos obtidos nos cortes da área PL do CPF incluído em epon nos grupos de animais de 6, 12 e 18 meses.

	Valores de F	
	Tempo de experiência (gl 2,32)	Álcool (gl 1,32)
Espessura das camadas I-III	0,98 (ns)	26,56 ***
N_V das células piramidais	3,40 *	37,22 ***
N_V das sinapses	4,15 *	1,03 (ns)
Relação sinapse/neurónio	2,99 (ns)	18,64 ***
Diâmetro do disco sináptico	5,54 **	0,76 (ns)
Superfície do disco sináptico	4,89 *	0,41 (ns)
V_V dos terminais	0,73 (ns)	0,74 (ns)
V_V da glia	2,09 (ns)	10,84 **

gl, graus de liberdade; ns, não significativo; *p<0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

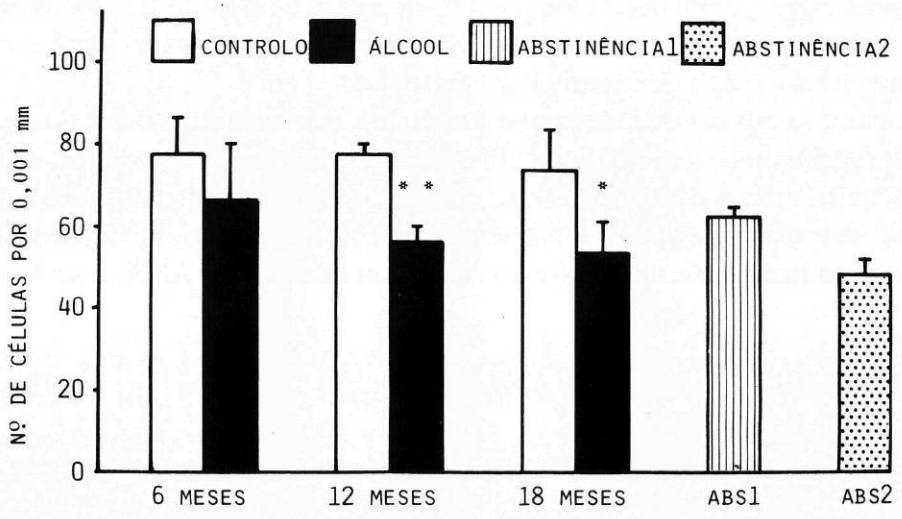


Fig. 53. Densidade numérica das células piramidais da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * p<0,05; ** p<0,01. ABS1 vs 12M Controlo, p<0,01; ABS1 vs 12M Álcool, p<0,01; ABS2 vs 18M Controlo, p<0,01; ABS2 vs 18M Álcool, p<0,05; ABS2 vs 12M Álcool, p<0,01.

etanol durante 12 meses. No grupo de abstinência 2 não só era significativa a diminuição do N_V das células piramidais quando se estabelecia a comparação com o grupo que recebeu álcool durante o mesmo período de tempo, como também com o grupo alcoolizado com a mesma idade (Fig. 53).

3.2.3. Estudos quantitativos das células piramidais com o método de Golgi

3.2.3.1. Análise métrica das arborizações dendríticas

A análise tridimensional dos parâmetros métricos das arborizações dendríticas das células piramidais da camada III do córtex da área PL cingiu-se aos dendritos basais (Figs. 42, 44) e aos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses e respectivos controlos e ao de animais de abstinência 2.

A Figura 54 mostra dois tipos diferentes de representação gráfica computorizada do domínio basal de uma das células analisadas e pertencente a um animal do grupo de abstinência 2. Tal como se disse para as células granulares da FD (2.2.4.1.) foi possível, quer na visão estereoscópica quer na projecção ortogonal, visualizar a distribuição relativa e a orientação dos dendritos das arborizações basais das células estudadas.

Os valores médios, por grupo de animais, encontrados nas medições de cada um dos parâmetros estudados, por célula, encontram-se representados nas Figuras 55 a 64. Tal como se procedeu com os parâmetros métricos das células granulares da FD (2.2.4.1.), também neste caso foram considerados dois grupos (311): parâmetros gerais e parâmetros dos segmentos dendríticos. Em relação a estes últimos, e pelas razões atrás referidas (2.2.4.1.), igualmente não se incluíram os resultados relativos aos segmentos intermediários do tipo iit (grau = 3 e grau $\geq$ 4) e aos segmentos terminais de ordem 0 e 5.

3.2.3.1.1. Parâmetros métricos gerais

Pode verificar-se que os valores destes parâmetros - área somática (Fig. 55), número total de dendritos basais (Fig. 56), número total de segmentos (Fig. 57), comprimento dendrítico total (Fig. 58) e distância radial (Fig. 59) - não variavam significativamente quando as células dos animais dos grupos alcoolizados eram comparadas com as dos respectivos controlos. A análise de variância revelou que, exceptuando a área somática, aqueles parâmetros sofriam aumento dependente do tempo de experiência (Quadro 4).

Na comparação dos resultados entre o grupo de abstinência e os controlo e alcoolizado da mesma idade, verificou-se que não havia diferenças significativas nos valores da área somática (Fig. 55) e da distância radial (Fig. 59); no entanto, o número total de dendritos (Fig. 56), o número total de segmentos (Fig. 57) e o comprimento dendrítico total (Fig. 58), por célula, encontravam-se significativamente diminuídos no grupo de abstinência em relação ao controlo e ao alcoolizado da mesma idade.

3.2.3.1.2. Parâmetros métricos dos segmentos

Os valores encontrados para os parâmetros métricos dos segmentos - comprimento dos segmentos intermediários de grau = 2 (Fig. 60) e de grau $\geq$ 4 (Fig. 61) e dos segmentos terminais considerado no seu total (Fig. 62) ou por ordem (Fig. 63) - nos dois grupos de animais alcoolizados não se mostravam significativamente diferentes dos obtidos nos grupos de controlos com a mesma idade. A análise de variância igualmente revelou não haver significância (Quadro 4).

No respeitante ao grupo de abstinência, não se verificaram variações significativas nos valores do comprimento total e por ordem dos segmentos terminais (Figs. 62, 63, 64) em relação aos dos grupos controlo e alcoolizado da mesma idade; contudo, o comprimento dos segmentos intermediários de grau = 2 (Fig. 60) mostrava-se significativamente diminuído e o

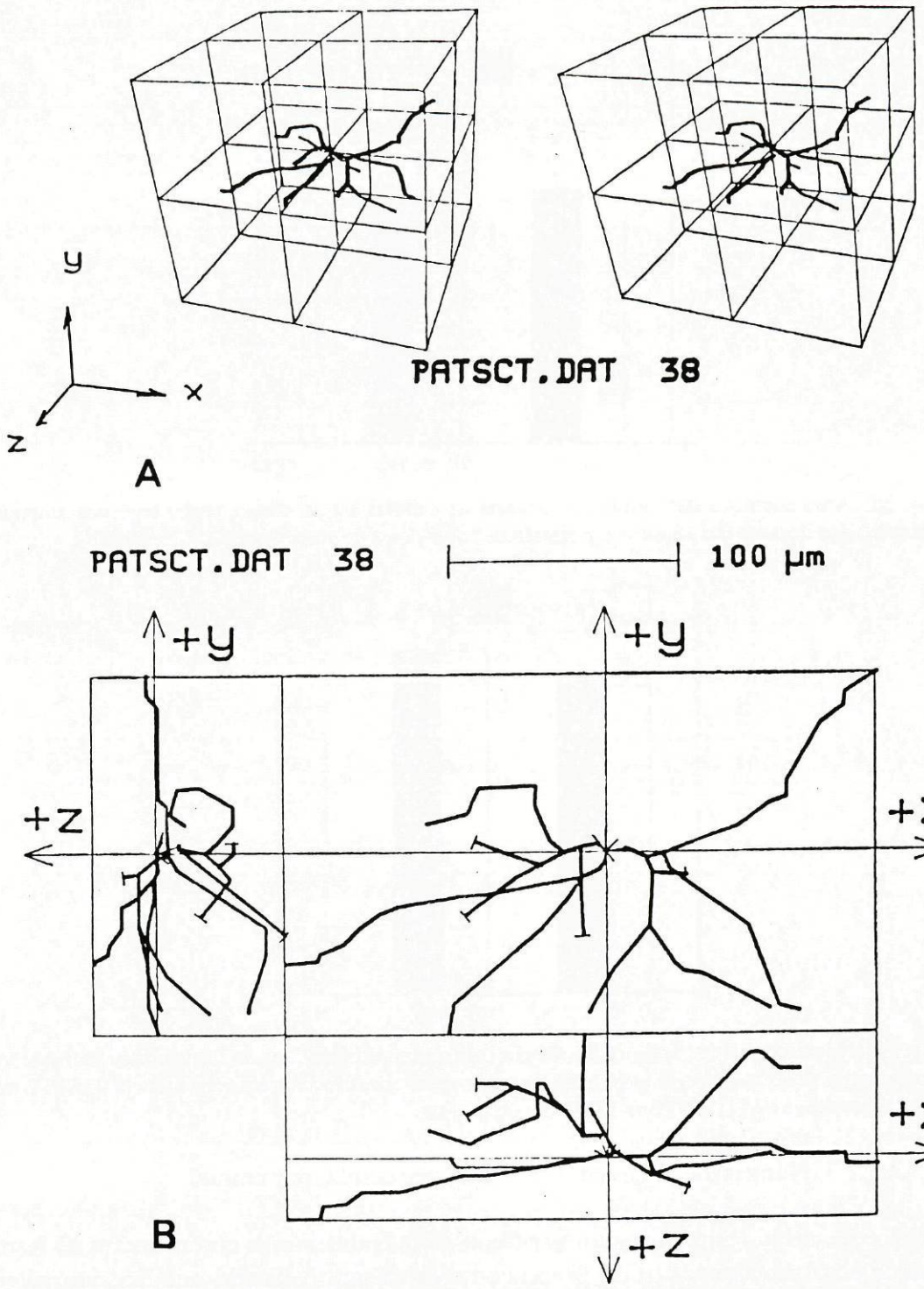


Fig. 54. Gráfico tridimensional (A) e respectiva projecção ortogonal (B) computorizados da arborização dendrítica basal de uma célula piramidal da camada III do córtex prelímbico. Em A, a representação corresponde a um par estereoscópico do mesmo campo dendrítico. Se o dendrito apical tivesse sido considerado, a sua representação gráfica coincidiria com o eixo dos yy. Abstinência 2.

dos de grau ≥ 4 (Fig. 61) significativamente aumentado no grupo de abstinência em relação ao controlo da mesma idade. Quando se estabeleceu a comparação entre os valores do grupo de abstinência e os do grupo alcoolizado durante 18 meses, verificou-se que os comprimentos daqueles segmentos intermediários, quer de grau = 2 (Fig. 60) quer de grau ≥ 4 (Fig. 61), não variavam significativamente.

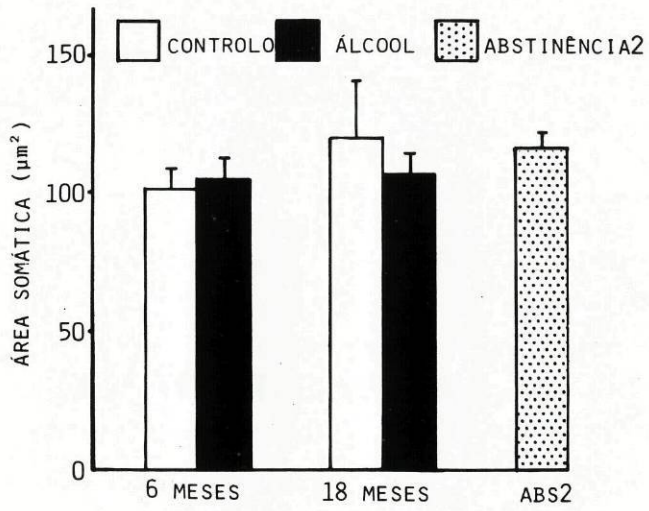


Fig. 55. Área somática das células piramidais da camada III do córtex prelímbico nos animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2.

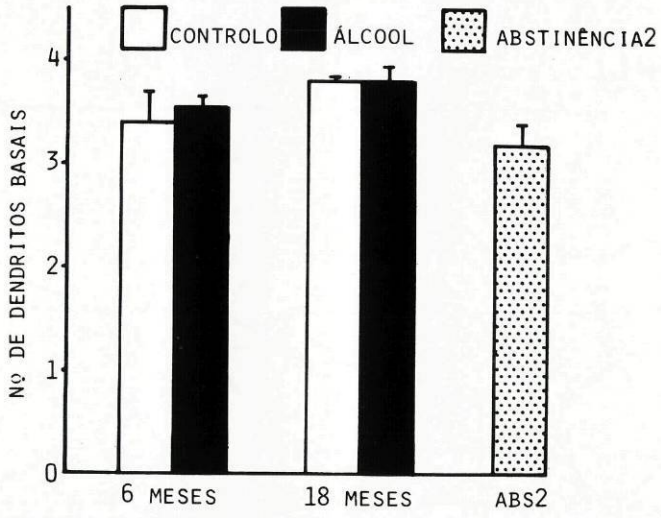


Fig. 56. Número total de dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,01$.

3.2.3.1.3. Número de segmentos por tipo, por célula, por animal

Pelo que atrás ficou expresso, verificou-se que, quando se comparavam os resultados do grupo de abstinência com os do grupo controlo da mesma idade, não existiam alterações significativas nos valores do comprimento dos segmentos terminais e da distância radial. Porém, verificou-se haver diminuição quer do número e comprimento totais dos dendritos quer do número de segmentos e ainda diminuição do comprimento dos segmentos intermediários de grau = 2 e aumento do dos segmentos de grau ≥ 4. Na tentativa de facilitar a interpretação de tais resultados, resolveu-se ampliar a análise dos dados métricos determinando o número de segmentos intermediários (grau = 2 e grau ≥ 4) e de segmentos terminais por cada animal e por célula, nos grupos estudados.

Quando se comparavam os valores do número de cada um destes tipos de segmentos, por célula e por animal, encontrados no grupo de 6 meses de alcoolização e respectivo grupo controlo, não se encontravam variações significativas. No entanto, quando a mesma

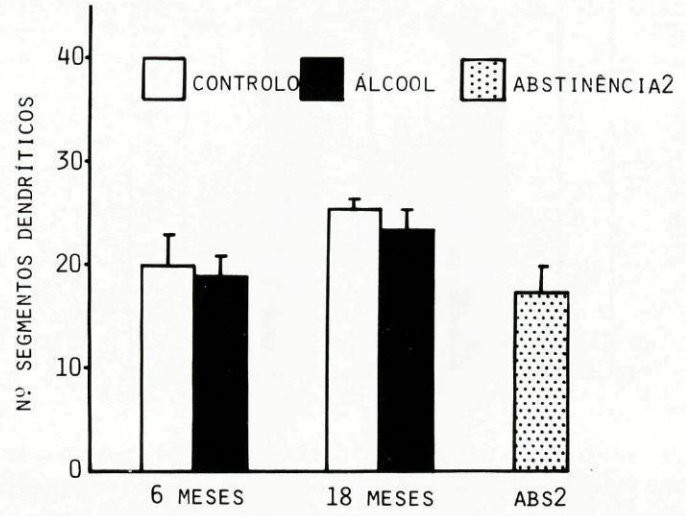


Fig. 57. Número de segmentos nos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,05$.

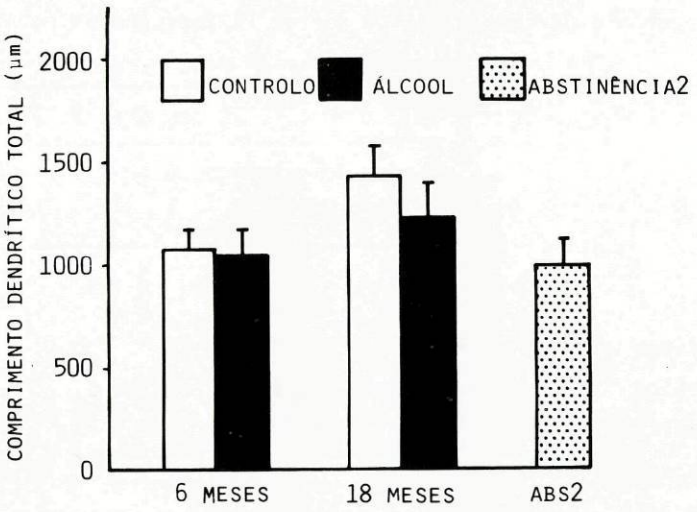


Fig. 58. Comprimento total dos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,05$.

comparação foi estabelecida entre o grupo alcoolizado durante 18 meses e o respectivo controlo verificou-se que havia diminuição significativa ($p<0,05$) no grupo alcoolizado para os segmentos intermediários de grau = 2 (tipo itt) e para os terminais (tipo t).

Em relação aos valores obtidos para o número de segmentos intermediários e terminais no grupo de abstinência, apresentavam-se significativamente diminuídos nos segmentos de ambos os graus ($p<0,05$) e nos terminais ($p<0,001$) quando comparados com os do grupo controlo da mesma idade; quando a comparação se estabeleceu com o grupo alcoolizado durante 18 meses, verificou-se que o número de segmentos intermediários de grau ≥ 4 (tipo iii) era significativamente menor ($p<0,01$) tal como o dos segmentos terminais ($p<0,05$). A análise de variância indicou que as variações encontradas no número de segmentos intermediários por célula e por animal eram dependentes do tempo de experiência (Quadro 5).

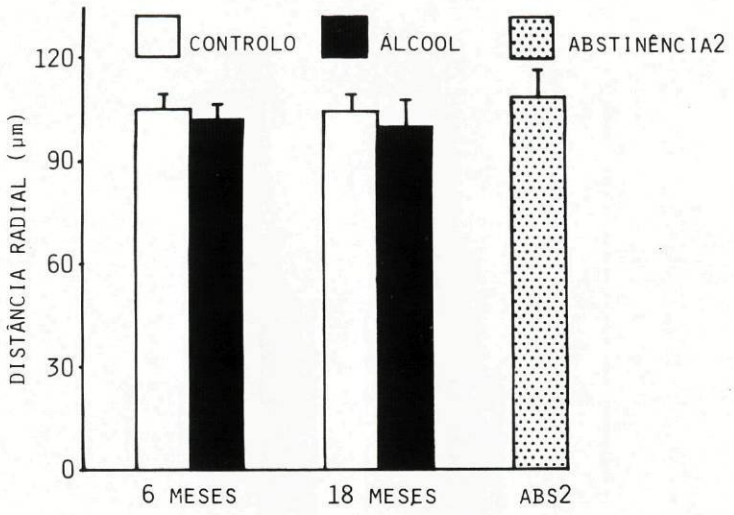


Fig. 59. Distância entre o centro do soma e as extremidades dos segmentos terminais dos dendritos basais (distância radial) das células piramidais da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2.

QUADRO 4

Resultados da aplicação da ANOVA para dois factores aos dados quantitativos obtidos nas células piramidais da camada III do córtex PL impregnadas pela prata, nos grupos de animais de 6 e 18 meses

	Valores de F	
	Tempo de experiência (gl 1,17)	Álcool (gl 1,17)
Área somática	3,34 (ns)	0,40 (ns)
Número de dendritos	14,34 **	0,74 (ns)
Número de segmentos	27,04 ***	2,14 (ns)
Comprimento dendrítico total	18,30 **	2,16 (ns)
Comprimento dos segm. terminais	0,79 (ns)	1,84 (ns)
Comprimento dos segm. intermediários		
Grau = 2	0,09 (ns)	0,01 (ns)
Grau ⩾ 4	1,66 (ns)	1,65 (ns)
Distância radial	0,93 (ns)	6,04 *
Densidade das espinhas dendríticas		
Segmentos terminais	0,26 (ns)	0,05 (ns)
Segmentos intermediários	1,91 (ns)	0,08 (ns)

gl, graus de liberdade; ns, não significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

3.2.3.1.4. Densidade das espinhas dendríticas

As contagens do número de espinhas nos dendritos basais das células piramidais da camada III do córtex da área PL foram feitas nas mesmas arborizações em que se efectuou a

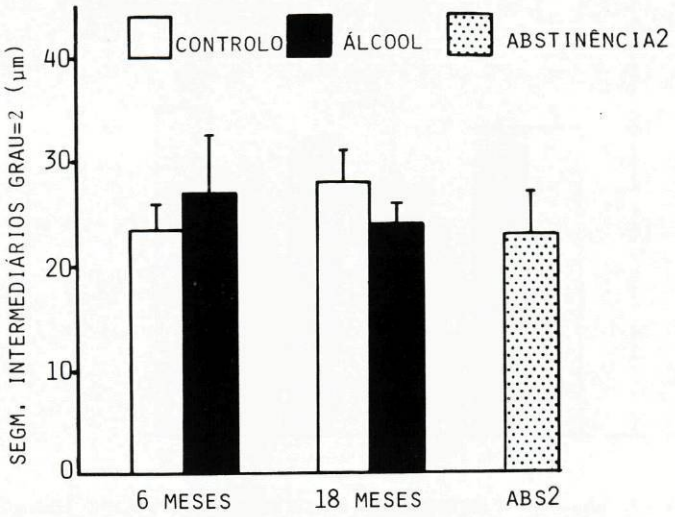


Fig. 60. Comprimento dos segmentos intermediários (grau = 2) nos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,05$.

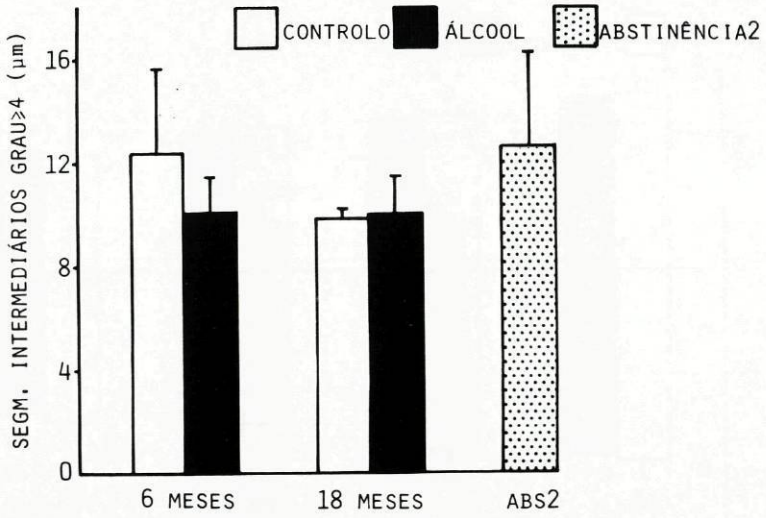


Fig. 61. Comprimento dos segmentos intermediários (grau ≥ 4) nos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2. ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$.

análise métrica. Estas contagens realizaram-se separadamente nos segmentos intermediários e nos segmentos terminais daqueles dendritos e estão representadas na Figura 65.

Verificou-se que aos 6 meses de alcoolização, e em relação aos controlos da mesma idade, havia ligeira diminuição da densidade das espinhas tanto nos segmentos intermediários como nos terminais; pelo contrário, aos 18 meses de alcoolização registava-se pequeno aumento do número de espinhas em ambos os tipos de segmentos quando comparados os resultados com os obtidos nos respectivos controlos. No entanto, nenhuma destas diferenças era estatisticamente significativa. A ANOVA igualmente mostrou que as variações não eram significativas (Quadro 4).

Em relação ao grupo de abstinência, o número de espinhas por unidade de comprimento dendrítico, em ambos os tipos de segmentos, mostrava-se praticamente coincidente ao encontrado no grupo de 18 meses de alcoolização e por isso não diferia significativamente dos valores encontrados neste grupo e no controlo da mesma idade (Fig. 65).

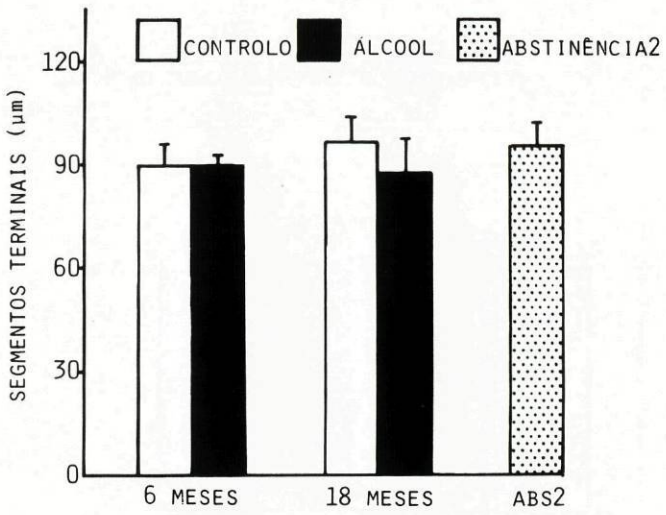


Fig. 62. Comprimento dos segmentos terminais dos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2.

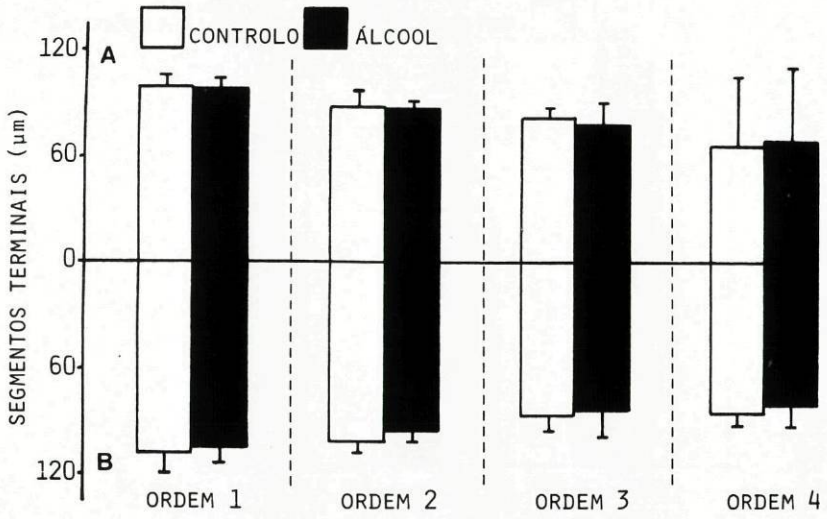


Fig. 63. Comprimento dos segmentos terminais, por ordem, nos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados durante 6 (A) e 18 (B) meses e respectivos controlos.

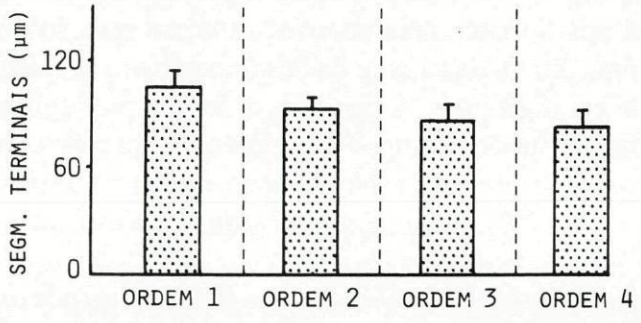


Fig. 64. Comprimento dos segmentos terminais, por ordem, nos dendritos basais por célula piramidal da camada III do córtex prelímbico no grupo de animais de abstinência 2.

QUADRO 5

Resultados da aplicação da ANOVA para dois factores ao número de segmentos por tipo, por célula e por animal, obtido nas células piramidais da camada III do córtex PL impregnadas pela prata, nos grupos de animais de 6 e 18 meses

	Valores de F	
	Tempo de experiência (gl 1,17)	Álcool (gl 1,17)
Nº segmentos/célula/animal		
Intermediários		
Tipo itt	7,23 *	0,80 (ns)
Tipo iii	14,93 **	0,32 (ns)
Terminais (tipo t)	1,93 (ns)	0,76 (ns)

gl, graus de liberdade; ns, não significativo; *p < 0,05; **p < 0,01

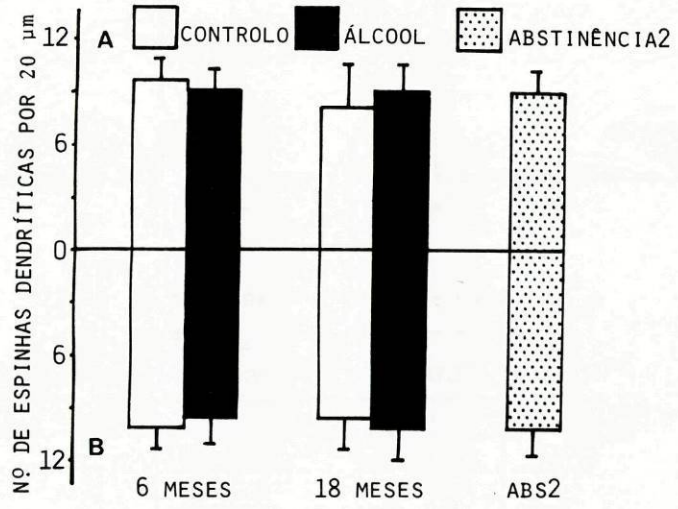


Fig. 65. Densidade das espinhas dendríticas nos segmentos intermediários (A) e terminais (B) dos dendritos basais das células piramidais da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 18 meses, respectivos controlos e de abstinência 2.

3.2.3.2. Análise topológica das arborizações dendríticas

Os resultados obtidos e as comparações estabelecidas entre eles incluíram, tal como no caso das células granulares da FD, o número total de partições, completas e incompletas, das árvores dendríticas basais das células piramidais.

A comparação das frequências das partições efectuada com os testes de Qui-quadrado e Kruskal-Wallis (69,330), agrupando-as em três classes de frequência, mostrou não haver diferenças significativas entre os grupos alcoolizados durante 6 e 18 meses e os respectivos controlos. Também não se encontraram diferenças significativas da distribuição de frequências das partições entre o grupo de abstinência 2 e o grupo controlo da mesma idade.

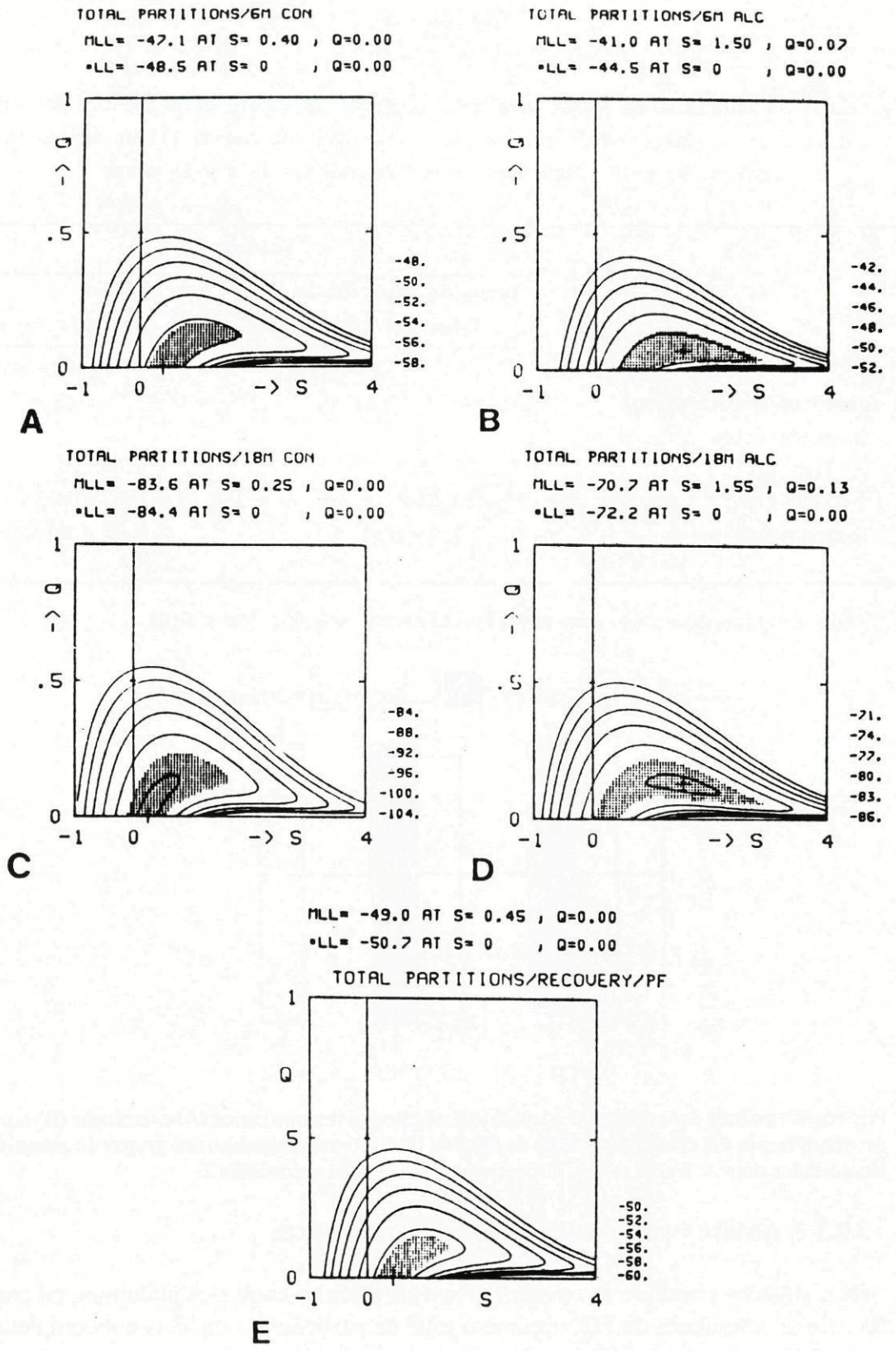


Fig. 66. Representação dos contornos das verosimilhanças do número total de partições das árvores dendríticas das células piramidais dos grupos de animais de 6 meses controlo (A) e alcoolizado (B), de 18 meses controlo (C) e alcoolizado (D) e abstinente (E). A área pontuada indica todos os modelos que se ajustam à amostra. Os valores das verosimilhanças dos contornos (LL) estão representados no lado direito da figura e os das máximas verosimilhanças (MLL) indicados pela cruz.

Os valores do parâmetro Q determinados em cada grupo foram sempre negativos. Este facto, que dificulta a comparação entre a distribuição das frequências observadas e as definidas para o parâmetro Q, tornou indispensável a aplicação do modelo definido para os dois parâmetros Q e S (325-327).

Os cálculos da máxima verosimilhança para o modelo Q-S (325-327) mostraram que, nos grupos controlo de 6 e 18 meses, o valor do parâmetro Q era zero e o do S 0,40 e 0,25, respectivamente (Fig. 66 A, C). Estes dados indicaram que os segmentos terminais têm maior probabilidade de se ramificarem (Q = 0) e que todos os segmentos, quaisquer que sejam as suas relações de proximidade com o corpo celular, apresentam a mesma probabilidade de ramificação pois o valor encontrado para o parâmetro S situa-se muito próximo de zero.

No grupo de animais alcoolizados durante 6 meses, os valores encontrados para Q e S foram de 0,07 e 1,50, respectivamente, enquanto que aos 18 meses de alcoolização foram de 0,13 e 1,55 (Fig. 66 B, D); os valores de Q > 0 indicam que, nestes grupos, a probabilidade dos segmentos se ramificarem é idêntica, qualquer que seja o seu tipo e, ainda, que é maior a probabilidade de ramificação dos segmentos proximais em relação aos distais.

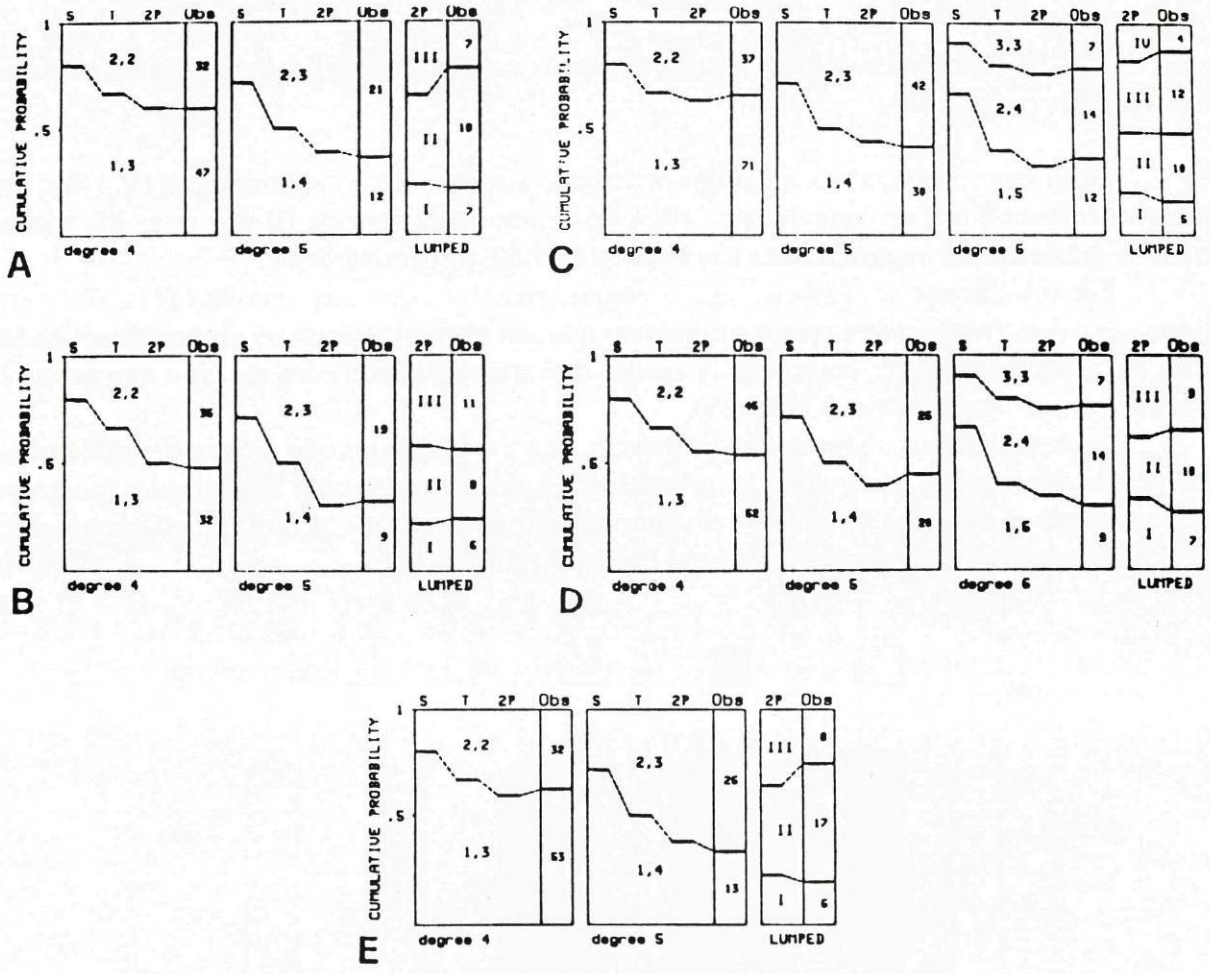


Fig. 67. Representação das probabilidades cumulativas das distribuições das partições de grau ≥ 4 das árvores filhas das arborizações dendríticas das células piramidais dos grupos de animais de 6 meses controlo (A) e alcoolizado (B), de 18 meses controlo (C) e alcoolizado (D) e abstinente (E). As frequências calculadas para os modelos segmentar (S), terminal (T) e para 2 parâmetros (2P) são comparadas com as frequências das partições observadas na amostra (Obs). Os pares de números indicam as partições; nas agrupadas (*lumped*) as diferentes classes contêm as partições (r, n-r). O modelo para 2 parâmetros é o que apresenta sempre melhor correspondência com as arborizações.

Os valores obtidos nas células piramidais dos animais sujeitos a abstinência (Fig. 66 E) aproximavam-se mais dos encontrados nos grupos de controlo (Fig. 66 A, C).

A análise da área de significância nos gráficos dos contornos das verosimilhanças (Fig. 66) mostrou que a sua morfologia era muito semelhante entre os controlos e o grupo sujeito a abstinência (Fig. 66 A, C, E) por um lado, e entre os grupos alcoolizados (Fig. 66 B, D), por outro. A sobreposição das áreas de significância aponta para a existência de modelos comuns às populações analisadas.

A Figura 67 representa as probabilidades cumulativas das frequências das partições de todos os grupos estudados; a sua análise demonstrou, em associação com os resultados obtidos nos contornos de verosimilhança, que o modelo para dois parâmetros (2P) é o que melhor explica as arborizações dendríticas em estudo, tal como acontecia com as células granulares da FD.

3.2.4. Estudos quantitativos ultrastruturais

3.2.4.1. Fracções volumétricas dos terminais nervosos e dos prolongamentos gliais no neurópilo da camada III

Os valores dos resultados obtidos no cálculo das densidades volumétricas (V_v) dos terminais nervosos e dos prolongamentos gliais no neurópilo da camada III do córtex PL encontram-se graficamente representados nas Figuras 68 e 69, respectivamente.

Em relação aos valores da fracção volumétrica dos terminais nervosos (Fig. 68) verificou-se que não havia diferenças significativas quando se comparavam os grupos alcoolizados com os respectivos grupos controlos. A análise de variância igualmente mostrou que as variações não eram significativas (Quadro 3).

No respeitante aos grupos de abstinência, os valores obtidos não diferiam significativamente dos encontrados nos grupos da mesma idade, quer controlos quer alcoolizados; no grupo de abstinência 1 o V_v dos terminais era significativamente menor que o do grupo que recebeu álcool durante o mesmo período de tempo (6 meses) (Fig. 68).

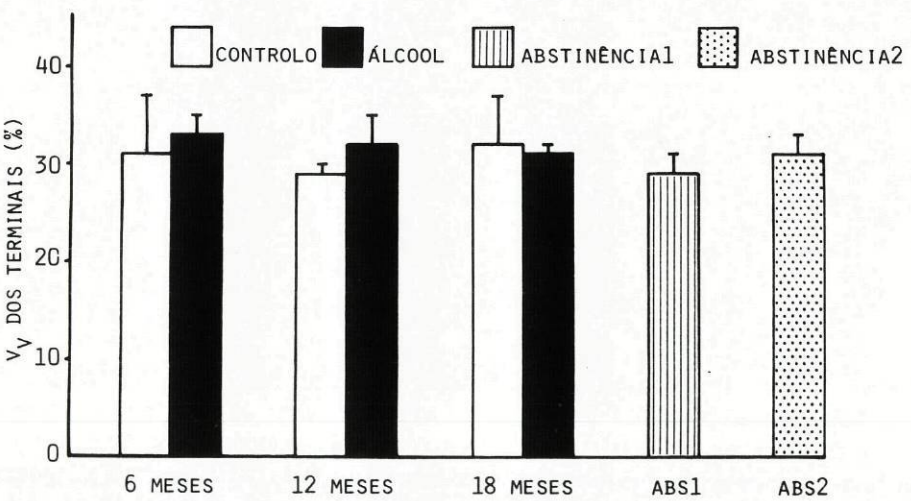


Fig. 68. Densidade volumétrica dos terminais nervosos do neurópilo da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ABS1 vs 6M Álcool, $p<0,01$.

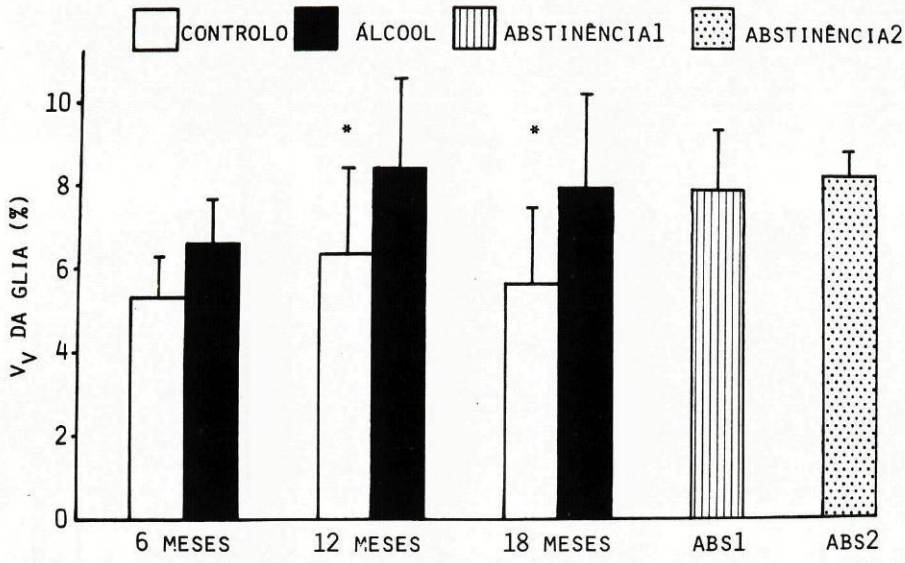


Fig. 69. Densidade volumétrica dos prolongamentos gliais do neurópilo da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * $p<0,05$.

Em relação ao V_v dos prolongamentos gliais (Fig. 69) verificou-se que nos três grupos alcoolizados os valores eram superiores aos dos controlos da mesma idade, embora só a partir dos 12 meses tal aumento fosse significativo. A análise de variância permitiu concluir que este aumento era unicamente dependente do factor álcool (Quadro 3).

Quanto aos grupos de abstinência, em ambos se verificou aumento não significativo dos valores da densidade volumétrica da glia em relação aos controlos da mesma idade. Também não se encontravam diferenças significativas quando se comparavam os resultados de cada um dos grupos de abstinência com o do grupo alcoolizado com a mesma idade e com o do que recebeu etanol por igual período de tempo (Fig. 69).

3.2.4.2. Sinapses do neurópilo da camada III

3.2.4.2.1. Número de sinapses por unidade de superfície

Os valores dos resultados obtidos na determinação do N_A das sinapses axodendríticas e axospinhosas da camada III do córtex PL em todos os grupos estudados encontram-se resumidos no Quadro 6.

No que respeita aos grupos alcoolizados, verificou-se que não havia variações significativas do número de perfis sinápticos não perfurados ou perfurados, ou do seu número total, entre os grupos de 6 e 12 meses e os respectivos controlos; aos 18 meses, verificou-se aumento significativo do N_A do total de perfis sinápticos quando se comparou o grupo alcoolizado com o controlo da mesma idade. A análise do Quadro 6 permite concluir que este aumento se ficava a dever a maior número de sinapses não perfuradas; embora se constatasse também aumento do número de perfis sinápticos perfurados em relação ao grupo controlo da mesma idade, este aumento não era estatisticamente significativo.

No grupo de abstinência 1 havia aumento significativo do número total de perfis sinápticos - também à custa dos não perfurados - quando se comparavam os resultados com os dos animais controlos e alcoolizados da mesma idade e os dos que ingeriram álcool durante o mesmo período de tempo. Quanto ao grupo de abstinência 2, unicamente se verificou aumento significativo do número total de sinapses obtido à custa quer das não perfuradas quer das perfuradas, quando se comparavam os resultados com os do grupo controlo da mesma idade.

QUADRO 6

Número de sinapses por unidade de superfície (N_A) do neurópilo da camada III do córtex PL

	6 MESES		12 MESES		18 MESES		ABSTINÊNCIA	ABSTINÊNCIA
	CONTROLO	ÁLCOOL[a]	CONTROLO[b]	ÁLCOOL[c]	CONTROLO[d]	ÁLCOOL[e]	1	2
	(6) *	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
TOTAL	21,2 ±	21,6 ±	25,1 ±	24,7 ±	19,2 ±	24,1 ±	30,7 ±	29,6 ±
(nº/100 µm²)	3,5	4,3	2,4	4,0	3,4	2,0	3,0	7,4
							b p<0,01	VS d p<0,01
	n.s.		n.s.		p < 0,05		VS c p<0,05	
							a p<0,01	
NÃO PERFURADAS	19,4 ±	19,6 ±	22,6 ±	22,5 ±	17,7 ±	21,8 ±	27,9 ±	26,6 ±
(nº/100 µm²)	3,0	3,8	1,7	3,4	3,1	2,2	3,0	6,8
							b p<0,01	VS d p<0,05
	n.s.		n.s.		p < 0,05		VS c p<0,05	
							a p<0,01	
PERFURADAS	1,8 ±	2,0 ±	2,6 ±	2,2 ±	1,5 ±	2,3 ±	2,8 ±	3,0 ±
(nº/100 µm²)	0,7	1,0	0,8	1,2	0,6	0,6	0,7	0,7
	n.s.		n.s.		n.s.			VS d p<0,01

* Número de animais estudados.
ns, não significativo.
Nos grupos de abstinência 1 e 2 estabeleceu-se a comparação com os grupos a,b,c e c,d,e, respectivamente; as comparações não significativas não foram assinaladas.

3.2.4.2.2. Diâmetro e área médios dos discos sinápticos

A determinação destes parâmetros foi feita a partir dos valores encontrados para o comprimento dos espessamentos pós-sinápticos dos perfis sinápticos, tendo em linha de conta a espessura dos cortes ultrafinos. Utilizou-se um método discreto de desdobramento (351) através de programa computorizado elaborado para este efeito.

Os valores encontrados estão graficamente representados nas Figuras 70 e 71.

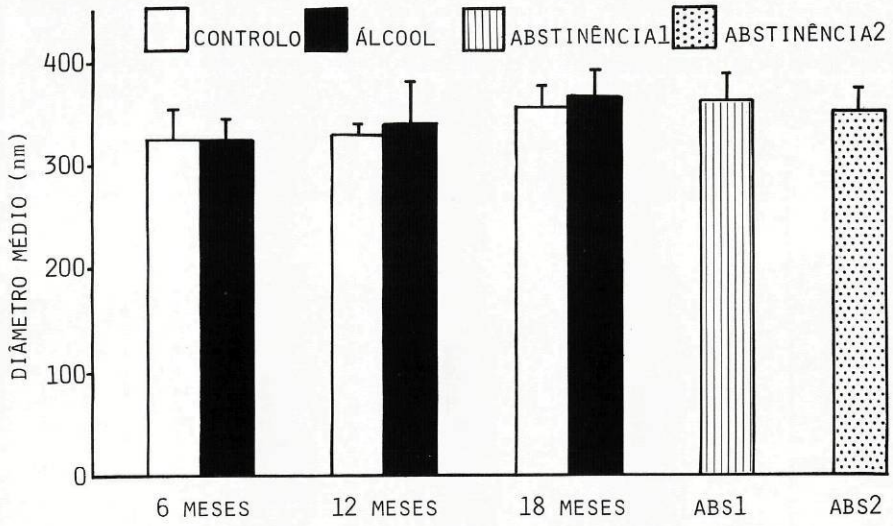


Fig. 70. Diâmetro médio dos discos sinápticos do neurópilo da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ABS1 vs 12M Controlo, $p<0,05$; ABS1 vs 6M Álcool, $p<0,05$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,01$.

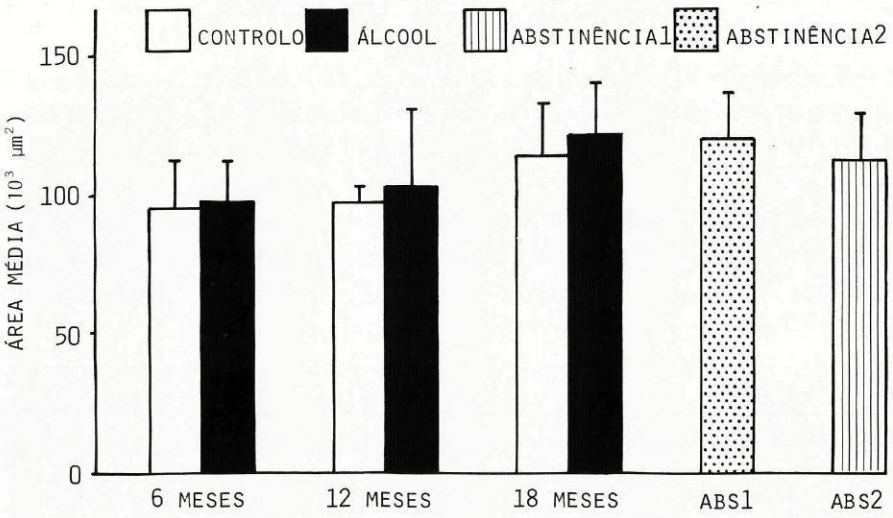


Fig. 71. Área média dos discos sinápticos do neurópilo da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ABS1 vs 12M Controlo, $p<0,01$; ABS1 vs 6M Álcool, $p<0,05$; ABS2 vs 18M Álcool, $p<0,01$.

Pode verificar-se que os três grupos alcoolizados mostravam valores destes parâmetros ligeiramente aumentados em relação aos controlos da mesma idade; este aumento era progressivo à medida que o tempo de experiência se prolongava, mas não era estatisticamente significativo. A análise de variância dos resultados permitiu concluir que o referido aumento era unicamente dependente do factor tempo de experiência quer em relação ao diâmetro quer à área médios dos discos sinápticos (Quadro 3).

No grupo de abstinência 1, os valores dos dois parâmetros eram significativamente maiores que no grupo controlo da mesma idade e que no grupo submetido a alcoolização durante igual período de tempo (6 meses). No grupo de abstinência 2, os valores encontrados eram menores que os obtidos para os grupos alcoolizado e controlo da mesma idade, embora tal variação fosse significativa somente em relação ao grupo sujeito a 18 meses de alcoolização (Figs. 70, 71).

3.2.4.2.3. Densidade numérica das sinapses

Os resultados obtidos na determinação do N_v das sinapses encontram-se graficamente representados na Figura 72.

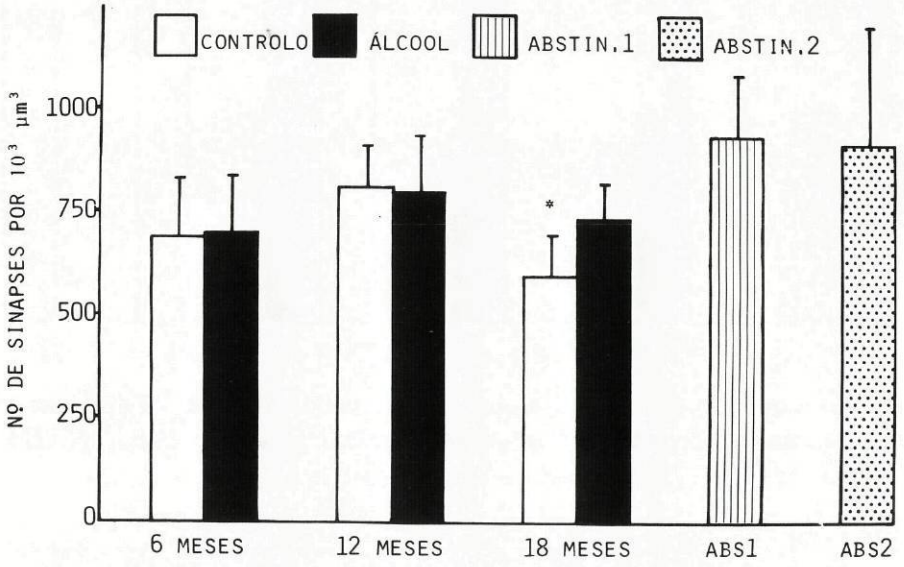


Fig. 72. Densidade numérica das sinapses do neurópilo da camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. * $p<0,05$. ABS1 vs 12M Álcool, $p<0,05$; ABS1 vs 6M Álcool, $p<0,01$; ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,05$.

Ao comparar os resultados encontrados nos grupos alcoolizados com os dos respectivos controlos, verificou-se que somente aos 18 meses existia aumento significativo do número de sinapses por unidade de volume. A análise de variância indicou que este aumento dependia da ingestão de álcool e do tempo de experiência (Quadro 3).

No grupo de abstinência 1, o valor do N_v era significativamente superior aos encontrados nos grupos alcoolizados durante 12 e 6 meses. No grupo de abstinência 2, o aumento do N_v das sinapses era significativo somente em relação ao grupo controlo da mesma idade (Fig. 72).

3.2.4.2.4. Relação sinapse/neurónio

Os resultados encontrados para o N_v das sinapses podem ser melhor valorizados se relacionados com o número de neurónios existentes no mesmo volume de neurópilo. Os resultados da determinação da relação sinapse/neurónio (10,25,72,307,350) encontram-se representados graficamente na Figura 73.

Verificou-se que embora os três grupos alcoolizados durante 6, 12 e 18 meses mostrassem que aquela relação estava aumentada quando comparada com a dos controlos da mesma idade, somente após 12 meses de alcoolização o referido aumento era significativo. A análise

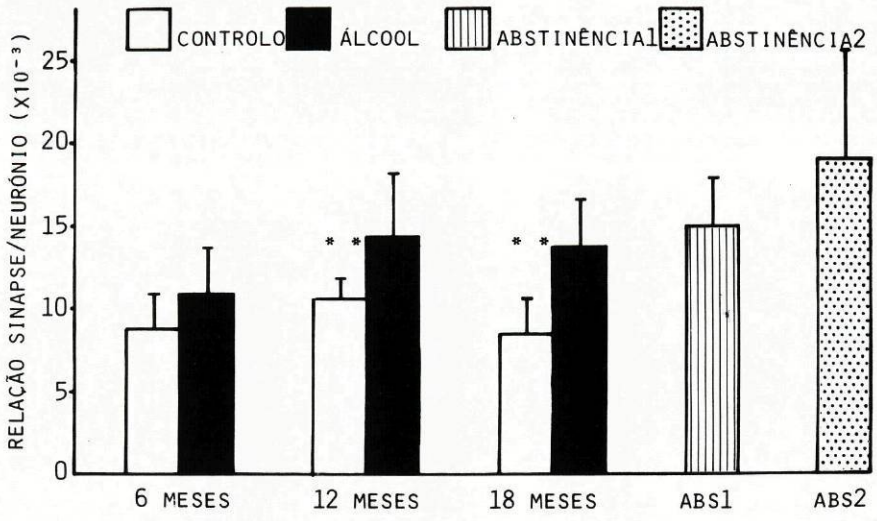


Fig. 73. Relação sinapse/neurónio na camada III do córtex prelímbico nos grupos de animais alcoolizados, respectivos controlos e abstinentes. ** $p<0.01$. ABS1 vs 12M Controlo, $p<0,01$; ABS1 vs 6M Álcool, $p<0,05$; ABS2 vs 18M Controlo, $p<0,01$; ABS2 vs 12M Álcool, $p<0,05$.

de variância indicou que este aumento do número de sinapses por neurónio era exclusivamente dependente do factor álcool (Quadro 3).

Verificou-se ainda que nos dois grupos de abstinência os valores da relação sinapse/neurónio eram superiores aos encontrados nos grupos alcoolizados e respectivos controlos da mesma idade. Os referidos aumentos, contudo, só eram significativos quando, para cada grupo, se comparavam os resultados com os encontrados no controlo da mesma idade e nos animais que haviam ingerido etanol durante o mesmo período de tempo (6 e 12 meses, respectivamente) (Fig. 73).

DISCUSSÃO

1. MODELO EXPERIMENTAL. ANIMAIS E DIETAS.

Não serão necessárias justificações exaustivas para dar suporte à utilização do modelo experimental que serviu de base ao presente trabalho. Na verdade, o seu emprego durante 10 anos no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto constitui experiência suficientemente longa para dar crédito à sua utilização, tanto mais que assenta em resultados sólidos com repercussão internacional nos meios que se dedicam a estudos deste tipo. Acresce que ao longo dos últimos anos têm sido confirmadas as vantagens deste modelo quando confrontado com outros adoptados por diferentes autores, pormenorizadamente discutidos numa dissertação de doutoramento (290) em que o mesmo protocolo experimental foi usado. É pois ponto assente que este modelo satisfaz as condições indispensáveis à avaliação dos efeitos da alcoolização crónica sobre o SNC. Por esta razão puderam incluir-se neste trabalho animais já utilizados para estudos efectuados no cerebelo e também no hipocampo, o que facilitou e tornou menos onerosa a obtenção do material para o presente trabalho.

São conhecidas as vantagens da utilização do Rato nos modelos experimentais de alcoolização (56,262,290,340) quer no tocante ao modo de absorção, metabolização e eliminação do álcool (56,262) quer por razões de índole prática relacionadas com a facilidade do seu manuseamento, a economia da sua manutenção e a rapidez do seu desenvolvimento apesar de, como acontece com a quase totalidade dos animais, ser difícil a sua adaptação à ingestão de soluções alcoólicas (199,290).

A ingestão do etanol em solução no líquido de bebida é não só a via mais eficaz para a sua administração por períodos de tempo tão prolongados como os que se pretendiam atingir como também a que reproduz mais aproximadamente as características da alcoolização no Homem (41,364). Esta via continua, por isso, a ser adoptada por muitos autores (153,165,188,248). De realçar, porém, que o método mais generalizado de administracão do álcool é o proposto por Lieber e col. (171-173) que usam dietas líquidas como veículo do álcool. Se com estas dietas os animais ingerem maior quantidade de etanol (249,345,348) e apresentam níveis de alcoolémia mais constantes e mais elevados (172), tal método apresenta claras desvantagens quer pelos elevados custos que implica quer por ser incompatível com períodos prolongados de administração; com efeito, logo após 6 meses de alcoolização os animais

adquirem lesões hepáticas, nomeadamente marcada degenerescência gorda (173,191, observações efectuadas no Instituto de Anatomia e não publicadas).

Outro ponto a discutir quanto ao presente modelo experimental é a não inclusão de grupos controlos puros cujos animais tivessem ingerido água e alimentos sólidos *ad libitum* (240,249,250,345-348), além dos grupos controlos em que os animais eram nutricionalmente controlados em relação aos alcoolizados.

Embora alguns daqueles autores (249,250,345-347) defendam ser importante a inclusão daquele tipo de controlos para um estudo comparativo assente em bases sólidas, prática seguida por outros investigadores em estudos de alcoolização pré-natal (263) e perinatal (352), demonstrou-se ao longo dos anos em que se vem trabalhando com o presente modelo não ser indispensável a sua inclusão mesmo após longos períodos de experiência: não só porque não foram detectadas diferenças, nem ponderais nem no número de neurónios, entre os dois tipos de grupo de controlo (345,348), como ainda as deficiências de nutrição consequentes a dieta hipoproteica por períodos prolongados não provocam no SNC lesões semelhantes às encontradas nos animais submetidos a alcoolização crónica (37,224,226). Por isso, no presente estudo, seguiu-se o modelo experimental com o qual se vem trabalhando no Instituto de Anatomia.

Embora os múltiplos estudos realizados neste Instituto sobre os efeitos da alcoolização sobre o cerebelo (216-218,290-292,294-304) tivessem incluído grupos de animais alcoolizados durante 1 e 3 meses, no presente estudo as observações iniciaram-se aos 6 meses de alcoolização visto ter sido a partir deste período experimental que se verificou a presença de alterações morfológicas, quer qualitativas quer quantitativas, com repercussão na conectividade dos circuitos neuronais das áreas em questão. Em observações piloto realizadas em animais submetidos a 3 meses de alcoolização, no respeitante às células piramidais da formação do hipocampo (FH), unicamente se verificou alterações a nível subcelular: aumento quer da deposição de lipofuscina (36) quer do número de corpos multivesiculares (221) e diminuição do número de poros nucleares (15).

Neste trabalho introduziram-se dois grupos de animais sujeitos a abstinência durante 6 meses, após períodos de alcoolização de 6 e 12 meses, tendo em vista verificar os efeitos resultantes da retirada do álcool. Estes efeitos só foram avaliados do ponto de vista morfológico por Phillips e Cragg (238,240, 241) e McMullen e col. (186) mas em modelos com períodos de abstinência curtos (2 a 4 meses) sequentes a alcoolização também de curta duração. Por outro lado, Riley e Walker (250), Walker e col. (345,346,348) e Lescaudron e col. (168,169) utilizaram modelos experimentais de alcoolização em que esta é seguida de um período de abstinência de duração mais curta que o de alcoolização; apesar desta disparidade, tais autores atribuíram à alcoolização os resultados observados sem levar em conta eventuais efeitos da abstinência. No presente trabalho, não só se estudaram os efeitos da alcoolização prolongada sobre o SNC como, pela primeira vez, também os consequentes à abstinência de longa duração, analisando em ambas as situações os mesmos parâmetros com o objectivo de distinguir as alterações morfológicas eventualmente provocadas pela retirada do álcool das atribuíveis à alcoolização.

Os autores atrás referidos (168,169,186,238,240,241,250,345,346,348) optaram pela supressão brusca do etanol. Dado que no presente estudo o período de abstinência observado foi mais longo, procedeu-se a redução progressiva da concentração do álcool no líquido ingerido durante as duas primeiras semanas de abstinência. Deste modo procurou-se evitar o aparecimento de síndromes agudos de privação (110) e simultaneamente proporcionar re-

adaptação às condições normais de ingestão de líquido que não ocasionasse bruscas perturbações metabólicas (95,345). Apesar disso, não foi possível evitar uma mortalidade de 25% verificada nos primeiros 45 dias de readaptação a qual, pelo menos em 2 casos, foi precedida de intensas crises convulsivas.

A comprovada existência, no Rato, de diferenças sexuais quer no metabolismo do álcool (97,245) quer na morfologia encefálica (87,88,151,181,182,323) e ainda a reconhecida existência de diferenças estruturais entre ambos os hemisférios cerebrais (87,92,323) levaram a que os animais estudados fossem do sexo masculino e os hemisférios do mesmo lado sujeitos ao mesmo tipo de análise morfológica após igual processamento laboratorial.

Quer as variações do peso corporal médio dos animais dos grupos alcoolizados e controlos, quer a quantidade média de álcool ingerida pelos submetidos a alcoolização, não se afastaram dos valores encontrados em grupos idênticos previamente estudados (290), conforme se verificou em animais utilizados expressamente para este trabalho dada a inexistência de material em quantidade suficiente para efectuar as análises quantitativas. Em relação aos animais dos grupos de abstinência, o aumento ponderal médio após a supressão do álcool era ligeiramente inferior ao verificado nos alcoolizados da mesma idade, embora as diferenças não se possam considerar significativas.

2. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS GERAIS

Considera-se relevante fazer uma avaliação crítica das diferentes metodologias quantitativas aplicadas neste trabalho antes de se analisarem e discutirem os resultados das diversas observações experimentais.

Saliente-se desde já que todos os resultados quantitativos apresentados foram calculados com a finalidade de se estabelecer comparação entre os grupos de animais alcoolizados, seguidos ou não de um período de abstinência, e os respectivos controlos da mesma idade.

O estudo quantitativo dos diferentes elementos estruturais analisados foi feito pela utilização de diferentes métodos estereológicos: a quantificação de neurónios e de sinapses, pela determinação dos seus valores relativos por unidade de volume (densidades numéricas); a dos terminais axonais e dos prolongamentos gliais, pelo cálculo das fracções volumétricas ocupadas por cada um (densidades volumétricas); a das arborizações dendríticas, pela sua análise métrica tridimensional.

No que respeita ao número de neurónios e de sinapses, e tendo em vista o objectivo comparativo deste trabalho, acima referido, as correspondentes densidades numéricas são o parâmetro que melhor possibilita tanto a avaliação das variações numéricas daquelas estruturas como a sua comparação entre os diferentes grupos.

Menos informativo teria sido calcular o número daqueles elementos por unidade de superfície (314). De facto, este parâmetro, utilizado por muitos autores (334,345,347) pode conduzir a resultados significativamente diferentes entre os grupos estudados sem que, contudo, se verificassem diferenças na densidade numérica, e vice-versa. Se o inconveniente da determinação dos N_As (314) é já bem patente nas quantificações do número de células, no que respeita à determinação do número de sinapses a sua utilização pode dar origem a erros ainda mais grosseiros de interpretação dos resultados (35,139,341), pois o facto das sinapses poderem apresentar forma e tamanho variáveis tem como consequência que os contactos sinápticos

mais extensos sejam seccionados com maior probabilidade em detrimento dos de menor tamanho, o que se traduz na possibilidade de se contarem preferencialmente perfis sinápticos de certos tipos (82). Valorizou-se o N_A das sinapses do neurópilo da camada III do córtex prelímbico (PL) com o fim de discriminar quantitativamente os dois tipos de sinapses nele existentes - as não perfuradas, de longe as mais abundantes, e as perfuradas. Embora se reconheçam as limitações inerentes à interpretação dos resultados fornecidos pela avaliação deste parâmetro, tal procedimento deveu-se ao facto de na determinação do N_V sináptico os dois tipos de contacto terem sido englobados numa única população.

Dado os objectivos deste trabalho, não foi necessário determinar os números absolutos para as diferentes estruturas analisadas nos diversos tipos de quantificação realizados, podendo referenciá-los unicamente a valores relativos por unidade de volume. A obtenção de tais números absolutos exigiria a determinação dos volumes das zonas do SNC que se estudaram (313,322,358) cujos valores deveriam ulteriormente ser corrigidos pelo factor correspondente à retracção sofrida pelo material ao ser laboratorialmente processado, principalmente no que respeita à inclusão (156,313,322). Mas a determinação destes valores e a sua correcção obrigaria à duplicação do número de animais por cada grupo estudado o que, dadas as características do modelo experimental utilizado, não foi possível conseguir, ao contrário do que se fez noutras circunstâncias experimentais e utilizando um modelo diferente (181,182).

Na interpretação das diferenças eventualmente encontradas na comparação entre os resultados obtidos no presente estudo e os referidos por outros autores há que levar em conta múltiplos e variados factores como as espécies animais utilizadas, o diferente processamento do material e principalmente as técnicas quantitativas empregadas e o local em que foram realizadas as quantificações (361). No entanto, no presente trabalho o estudo de cada parâmetro obedeceu a critérios rígidos de uniformidade quer no respeitante ao tratamento do material quer na realização das quantificações no mesmo local pelo emprego da mesma metodologia morfométrica.

No entanto, não se pode deixar de considerar, nas circunstâncias experimentais em que se trabalhou, que as variações de volume das áreas em estudo são um dos parâmetros mais importantes a analisar nas avaliações quantitativas; tais variações podem originar alterações significativas nos valores das densidades numéricas sem variação concomitante no número de estruturas em questão (41). Como o valor da espessura das diferentes camadas corticais pode ser considerado como indicador de eventuais variações volumétricas (14,207,234,314), foi o parâmetro utilizado como índice de referência dos volumes corticais. As normas a que obedeceu a determinação da espessura das camadas corticais nas duas áreas estudadas, realizada em cortes obtidos sempre segundo a mesma orientação e obedecendo a critérios uniformes, conforme se referiu no capítulo "Material e Métodos", foram as apropriadas às características da configuração morfológica geral de cada uma dessas áreas. Por isso se utilizou a espessura das camadas corticais como parâmetro de referência na interpretação dos resultados obtidos nas quantificações efectuadas e nas comparações entre os diferentes grupos.

Os métodos estereológicos usados na determinação das densidades numéricas foram o *disector* (41,77,280) e um método discreto de desdobramento (197,301,351) e na das densidades volumétricas a metodologia clássica de Weibel (351).

O *disector* (41,77,280) foi empregado na determinação das densidades numéricas dos diferentes tipos neuronais estudados e das sinapses entre os terminais das fibras musgosas (TFM) e as excrescências dendríticas das pirâmides de CA3. Este método, como se referiu no

capítulo "Material e Métodos", é independente da forma, tamanho, orientação e tipo de secção das partículas a estudar (41,77,280) e exige como pressupostos que os cortes onde se fazem as contagens sejam paralelos e separados por distância conhecida, nunca superior às dimensões da partícula em causa (41,77,129) e que esta possa ser identificada pelo seu perfil.

As quantificações neuronais foram efectuadas em séries de cortes semifinos consecutivos realizados sempre no mesmo ultramicrótomo e a sua espessura de 2 ou 3 μm conforme a área em questão. Como se tratava de um estudo exclusivamente comparativo entre grupos de animais sujeitos a condições experimentais e os respectivos controlos e dado que todo o material foi processado da mesma forma para o emprego dos métodos morfométricos referidos, não se procedeu à avaliação mais exacta da espessura dos cortes utilizando uma das diferentes técnicas adoptadas por alguns autores (77,116,156,174,313). Tal como West e col. (357) em trabalho recentemente publicado utilizando o *disector* para a determinação da densidade numérica das células granulares em diferentes porções da fáscia denteada (FD), consideraram-se os valores das espessuras nominais como as correspondentes à altura do *disector*.

Os critérios de definição das partículas como unidade de contagem naturalmente variaram de acordo com a estrutura em questão. Nas quantificações do número de células consideraram-se os perfis nucleares, independentemente de possuírem ou não imagem nucleolar.

Em relação às sinapses entre os TFM e as espinhas dendríticas das pirâmides de CA3, cujo N_v foi determinado pelo *disector*, aquele último critério não foi tão facilmente definido e incluíu vários aspectos, já que foi necessário,antes de mais, discriminar o tipo de sinapse em estudo. Quando as sinapses mostravam mais que um espessamento pós-sináptico - situação mais frequente - eram consideradas como uma unidade de contagem sempre que aqueles espessamentos correspondessem a um único perfil pré-sináptico.

A quantificação das sinapses do neurópilo da camada III do córtex PL foi realizada antes da contagem do número de células daquela camada, ocasião em que não se dispunha da possibilidade do emprego do *disector*; teve-se no entanto oportunidade de recorrer a um método discreto de desdobramento computorizado (197,198,301), utilizando um programa do *Netherlands Institute for Brain Research*, que de entre os métodos estereológicos clássicos (351) é o que permite obter resultados mais fiéis para o N_v . Este método possibilita o cálculo da densidade numérica das sinapses em amostras quantitativamente mais significativas e com rigor semelhante ao dos que utilizam cortes seriados (76, 329). Por isso entendeu-se ser desnecessário repetir mais tarde a quantificação das sinapses pelo emprego do *disector*.

No estudo quantitativo da organização do córtex PL determinou-se um parâmetro de significado mais exacto e mais informativo do que o dado pelo número de sinapses e de neurónios considerados independentemente, embora no mesmo volume. Este parâmetro é a relação sinapse/neurónio (10,25,72,307,350), isto é, o número de sinapses por neurónio numa mesma unidade de volume. Na verdade, o valor desta razão é de muito maior rigor na interpretação dos resultados já que exprime mais fielmente as variações das densidades numéricas, celulares e sinápticas, entre os diferentes grupos estudados.

O estudo quantitativo dos terminais axonais e dos prolongamentos gliais do neurópilo da camada III do córtex PL e dos TFM foi feito pelo cálculo das suas densidades volumétricas. Utilizaram-se os métodos morfométricos clássicos (351) obtendo-se, num mesmo volume de neurópilo, as fracções ocupadas por cada um deles.

Para completar o estudo quantitativo dos neurónios em causa, impunha-se a análise

dos padrões das suas arborizações dendríticas que se realizou em cortes da FH e do CPF impregnados pela prata.

O emprego do método de Golgi tem dado provas de relevante eficácia ao facultar a definição da forma e arranjo espacial das arborizações dendríticas de diferentes tipos de neurónios (40). No entanto são conhecidas as limitações deste método: não só impregna um pequeno número das células presentes nos cortes como pode não impregnar completamente a totalidade de um neurónio (265,317).

Surgiram grandes dificuldades ao impregnar as células piramidais do córtex PL quer através da tripla impregnação argêntica preconizada por Valverde (317) quer com a aplicação do método de Golgi rápido (192). Estas dificuldades foram extensíveis não só às células granulares da FD como também às pirâmides de CA3 do hipocampo. Embora com estes métodos as células piramidais das camadas corticais da superfície dorsolateral do CPF surgissem com razoável qualidade de impregnação, eram em menor quantidade as que se visualizavam nas camadas da superfície medial, com particular incidência na área PL. No respeitante à FH, o número de neurónios com boa qualidade de impregnação argêntica foi sempre muito pequeno, principalmente no que respeita às pirâmides de CA3.

O ensaio do método de Golgi-Stensaas (279), habitualmente utilizado para material embrionário, após a introdução de algumas alterações propostas por Eckenhoff e Rakic (96) no estudo da FH do Macaco em diferentes fases de desenvolvimento incluindo a idade adulta, proporcionou a obtenção de melhores resultados nas células piramidais do córtex PL e nas granulares da FD, o mesmo não acontecendo, no entanto, no caso das células piramidais de CA3. Por isso, dado o número reduzido de células impregnadas, teve que ser excluída deste estudo a análise das árvores dendríticas destas últimas células.

No entanto foi possível, em relação às células piramidais do córtex PL e às granulares da FD, obter número de neurónios suficientemente bem impregnados para a sua observação qualitativa e, na maioria dos grupos estudados, para a sua análise métrica tridimensional. Mesmo assim, os critérios em que se baseou a selecção das células para este último estudo (83,84,310, 311,360) obrigaram à exclusão dos grupos de animais alcoolizados e controlos de 12 meses já que nestes grupos não foi possível conseguir, por animal, número suficiente de células que satisfizessem os critérios preconizados (ver "Material e Métodos"). Não se encontrou justificação para que o número destas células impregnadas fosse nesta idade inferior, em ambos os tipos de córtex, ao encontrado nos animais dos restantes grupos.

A ausência de número suficiente de células bem impregnadas no grupo de controlo de 12 meses impossibilitou o estudo do grupo de animais de abstinência após 6 meses de alcoolização por inexistência do grupo de controlo respectivo.

Nas células piramidais do córtex PL só as arborizações basais obedeciam ao conjunto dos critérios definidos. Contudo, para o estudo de conectividade neuronal que se teve em vista, estas arborizações têm grande interesse já que se distribuem horizontalmente ao longo da camada III deste córtex.

A utilização do sistema semi-automático de medida permite uma avaliação tridimensional das arborizações dendríticas (83,210,310,311) muito difícil de conseguir com o emprego de métodos quantitativos aplicados à projecção bidimensional das árvores neuronais (31,94,269,312,353). Ao facultar a obtenção dos valores métricos, quer da totalidade da árvore dendrítica de um neurónio quer das suas partes individuais, proporciona a discriminação de alterações finas (310,311). A detecção destas alterações não teria sido possível pela aplicação de outros métodos quantitativos como o das esferas concêntricas de Sholl (269) ou o dos círculos concêntricos de Eayrs (94).

Devido à complexidade do arranjo tridimensional das ramificações dendríticas, são muitas as variáveis a ter em conta para caracterizar quantitativamente as suas propriedades estruturais; por isso é aconselhável utilizar somente as de maior poder discriminativo quando se comparam neurónios pertencentes a diferentes grupos, quer na detecção da existência de diferenças quer na especificação do seu tipo (311). As variáveis que se analisaram, e que se agruparam em parâmetros métricos gerais e parâmetros métricos dos segmentos, foram as aconselhadas por Uylings e col. (311) e De Ruiter e Uylings (83) e são as mais frequentemente utilizadas e que melhor caracterizam os aspectos métricos da árvore dendrítica de um neurónio.

Um dos factores que condiciona a interpretação dos resultados obtidos na análise métrica de dendritos é a presença de ramos dendríticos cortados, facto inevitável nestas circunstâncias mas que deve ser levado em conta quando se analisam parâmetros como o comprimento dendrítico total. Somente quando as células são objecto de reconstrução a partir de cortes seriados (84,176), o que pressupõe elevadíssimo consumo de tempo na análise de reduzido número de neurónios, as medidas dos comprimentos obtidas não são subestimadas. Contudo, a análise métrica dos segmentos individuais permite ultrapassar aquele obstáculo pois só são incluídos no cálculo daquele comprimento os segmentos completos (311).

Para se proceder ao estudo dos segmentos individuais é necessária a sua ordenação segundo um sistema adequado que vise o seu ulterior agrupamento e a possibilidade de análise de grupos de dendritos de uma mesma ordem independentemente do seu tipo, ou então por tipo e por ordem (311). O sistema utilizado para esta ordenação foi o centrífugo (83,310-312) que, em termos de análise métrica, é o método indicado sempre que o padrão de ramificação é tal que os segmentos originados em cada bifurcação sejam metricamente equivalentes; é o que sucede tipicamente nos dendritos basais dos neurónios corticais (273). A ordenação centrífuga apresenta vantagens em relação ao sistema centrípeto (31,227,282,290,312) entre as quais se salienta o facto de se poder entrar em linha de conta com a ausência de porções dendríticas terminais, que ocorre pelas razões já apontadas, e deste modo não influir nem alterar a ordenação do resto da arborização; além disso, o número de ordem de segmentos equivalentes nunca se altera durante o crescimento dendrítico (312) o que no caso presente poderia ocorrer por razões que adiante se discutirão.

Para completar a avaliação dos diferentes parâmetros quantitativos das arborizações é importante conhecer-se como se comportam as espinhas dendríticas, pois desempenham papel de relevo nos fenómenos de transferência de informação ao nível dos contactos sinápticos (228). Se a superfície receptora de um neurónio depende da extensão da sua arborização dendrítica, em cada dendrito esta superfície está em relação com a densidade, dimensões e distribuição das suas espinhas. Além disso, se um dos sinais precoces de deterioração dendrítica é a perda das suas espinhas (105,212,220), também os fenómenos de remodelação neuronal incluem modificações plásticas destas estruturas traduzidas em aumento da densidade e/ou variações do comprimento (48,212,299). Impunha-se, pois, completar o estudo quantitativo das árvores dendríticas das células granulares da FD e das células piramidais da camada III da área PL impregnadas pelo método de Golgi com a contagem das suas espinhas, segundo critérios definidos por outros autores (48,83,85). O facto dos cortes terem sido montados e cobertos por resina sem a utilização de lamelas dificultou uma avaliação mais completa que a simples quantificação numérica, que permitisse a determinação dos seus comprimentos e a discriminação das variedades de espinhas que se encontram em ambos os tipos de células estudadas (85,231).

Dado que o número de espinhas por unidade de comprimento dendrítico está em relação com a ordem dos segmentos (100, 229) e que as porções dendríticas mais distais são geral-

mente mais afectadas pelos processos degenerativos, estabeleceu-se que as quantificações deveriam ser realizadas em porções diferentes das arborizações; no caso das células granulares fizeram-se separadamente em porções dendríticas localizadas no terço interno e no terço externo da camada molecular e nas células piramidais do CPF em segmentos dendríticos intermediários e terminais.

Como entre os diferentes grupos de animais não se observaram diferenças apreciáveis na espessura dos dendritos capazes de influenciar a visualização das espinhas, foi possível avaliar prováveis alterações nas suas densidades ao comparar segmentos dendríticos de células dos diferentes grupos estudados; por isso não se fizeram correcções dos valores encontrados, conforme preconizado por outros autores (48,83,102).

A avaliação de todos os parâmetros quantitativos que caracterizam as arborizações neuronais não deve limitar-se à análise métrica dos diferentes parâmetros dendríticos já discutidos pois deve incluir o estudo dos padrões do arranjo dos ramos na árvore, isto é, a definição quantitativa da topologia dendrítica (30,140,260,316,325-327,330).

A análise topológica destas arborizações foi efectuada através dum conjunto de métodos de definição recente que possibilitam a comparação das árvores observadas, quer entre os diferentes grupos (326,327,330,331) quer com modelos teóricos referidos a modos particulares de "crescimento" (140,324,325,327,330). Esta análise tem sido mais frequentemente aplicada em estudos de desenvolvimento de árvores dendríticas já que permite o estudo do modo de ramificação e a disposição dos seus ramos durante o desenvolvimento da árvore (326,327,330). No entanto, aplica-se também a árvores dendríticas já completamente desenvolvidas pois proporciona a comparação entre diferentes grupos e indica se as árvores em estudo pertencem à mesma população ou a populações diferentes e se o seu padrão de organização topológica é ou não explicado por modelos teóricos (330). Como o presente estudo abrange as células granulares da FD cuja neurogénese, no Rato, se prolonga até aos 12 meses de idade e como, além disso, se procura detectar eventuais modificações dendríticas naquelas células e nas pirâmides do córtex PL como resposta plástica à situação criada pelas presentes circunstâncias experimentais, a aplicação da referida análise topológica justifica-se plenamente.

O método utilizado neste estudo topológico foi o desenvolvido por Verwer e Van Pelt (324,326,327,330) o qual, em relação a outros métodos topológicos (30,140,260), apresenta a vantagem de possibilitar a avaliação de amostras dendríticas de tamanho relativamente pequeno (330) visto que, utilizando as distribuições das frequências das partições, não condiciona perda da informação que é analisada em cada amostra (324-327,330) e facilita o processamento subsequente dos dados. Na verdade, se por um lado o número de partições obtidas por grau (número de segmentos terminais da árvore) é inferior ao dos tipos ambilaterais dos arranjos tridimensionais das árvores, por outro lado não há perda da informação sobre os modelos de "crescimento" pois embora se perca a localização exacta de algumas partições a sua frequência é conservada (325).

A utilização do modelo definido para o parâmetro Q, que relaciona as probabilidades de ramificação dos segmentos terminais e dos intermediários (327,330), não possibilitou o ajuste das partições observadas nas árvores dendríticas dos animais controlos, alcoolizados e abstinentes com as definidas teoricamente para os valores de Q. Por isso tornou-se necessária a análise com o modelo definido para dois parâmetros, onde a inclusão do parâmetro S entra em linha de conta com a posição dos segmentos na árvore dendrítica, neste caso ordenados de modo centrífugo (30,312); possibilita-se assim que todos os segmentos de determinada ordem sejam equivalentes dado que esta ordenação agrupa os segmentos do mesmo tipo, seleccionados a partir da raíz topológica da árvore.

3. FORMAÇÃO DO HIPOCAMPO

Entre as alterações degenerativas verificadas no encéfalo dos animais sujeitos ao tratamento pelo álcool etílico uma das mais notórias é a morte celular, de expressão variável conforme a zona estudada e a duração dos períodos experimentais (169,292,298,345). Estes fenómenos degenerativos são quase constantemente acompanhados de manifestações plásticas das diferentes estruturas da área em causa que traduzem as potencialidades do SNC em resposta a situações de agressão (48,112,113,135,138,139,212,281,315,350,354).

Esta dupla vertente degenerativa e reorganizativa observada no modelo experimental utilizado, foi já escalpelada em múltiplos estudos realizados neste Instituto, nomeadamente no córtex do cerebelo. Os sinais degenerativos traduziam-se por morte neuronal (290,292,298), empobrecimento das arborizações dendríticas (300), degenerescência axonal (216,301), redução do número de sinapses (301) e alterações de organitos de diferentes compartimentos celulares (218,291,294,295,303) entre as quais é de realçar a deposição precoce e progressiva de lipofuscina (217,294,303). Estas manifestações degenerativas acompanhavam-se de sinais de plasticidade dendrítica (296,299), axonal (297,302) e sináptica (296,301).

Verificados os efeitos da alcoolização crónica sobre a organização estrutural do cerebelo, procurou-se no presente trabalho estender o estudo daqueles efeitos à formação do hipocampo (FH) e ao córtex prefrontal (CPF), áreas corticais de padrão citoarquitectónico mais complexo e de grande importância funcional em actividades cognitivas superiores, com o propósito de averiguar se, a partir dos 6 meses de alcoolização, se mimetizavam nestas áreas os efeitos do etanol sobre o cerebelo.

Além disso, foi ainda objectivo, aliás não menos importante, esclarecer qual o tipo de resposta dos elementos morfológicos dos circuitos neuronais destas áreas à abstinência alcoólica igualmente prolongada, já que os resultados dos estudos existentes sobre a matéria, realizados na FH, são em muitos aspectos controversos (186,238,241), chegando-se ao ponto de autores que utilizam modelos em que a alcoolização é seguida de abstinência não considerarem a possível responsabilidade desta nos resultados encontrados (168,240,345,348).

No respeitante à morte celular, os resultados obtidos na determinação das densidades numéricas das células granulares da FD e das células piramidais de CA3 do hipocampo mostraram franca redução dos valores nos animais alcoolizados logo a partir dos 6 meses, a qual se aproximava dos 40% e 30%, respectivamente. Esta redução observava-se ao longo de todo o período experimental e era acompanhada de diminuição da espessura das camadas correspondentes, o que sugere diminuição do número total destes dois tipos de neurónios e não só do seu número relativo.

Dado que não foi frequente a visualização concomitante de perfis degenerados, é de supor que os processos degenerativos não ocorram de modo brusco mas sim progressivamente, tal como havia sido verificado no cerebelo (290,292); por isso não foi possível estabelecer, desde os 6 meses de experiência, um período a partir do qual houvesse particular incidência dos fenómenos degenerativos.

A redução dos valores das densidades numéricas encontrada tanto nas células granulares da FD como nas células piramidais de CA3 pode ser considerada, de acordo com os resultados da análise de variância, dependente dos efeitos do etanol. Contudo, no caso das células granulares, a mesma análise indicou haver influência da idade dos animais.

Nos ratos dos grupos controlo estudados, de idades compreendidas entre os 8 e os 20 meses, os valores das densidades numéricas destas células aproximavam-se dos referidos por outros autores que utilizaram quer metodologia morfométrica clássica (38,39,356) quer o *di-*

sector (357), método quantitativo mais recente empregue no presente estudo.

A variação do número de células granulares com a idade está de acordo com as características da neurogénese destas células que, no Rato, se prolonga até ao fim do primeiro ano de vida (21,22,74) e não está relacionada com variações volumétricas da camada granular dependentes da idade do animal, já que Coleman e col. (62) não encontraram variações significativas deste parâmetro em ratos com idades compreendidas entre os 4 e os 37 meses.

Tendo em conta estas características neurogénicas, a morte neuronal que ocorre durante a alcoolização, e se agrava na abstinência, poderia depender também do facto de as células progenitoras serem atingidas. Tal não deve, contudo, acontecer visto que os valores encontrados nos animais alcoolizados - significativamente menores que os dos controlos da mesma idade - mostram aumento do número relativo das células granulares até aos 12 meses de experiência, que ocorre paralelamente ao observado nos respectivos controlos.

A redução do número de células da FH nos grupos submetidos ao tratamento pelo álcool corrobora os resultados apontados por outros autores não só nesta região (168,249,345,346,348) como também no cerebelo (237,239,345,346) e nos corpos mamilares (169), embora utilizando modelos de alcoolização de duração mais limitada e seguida ou não de abstinência. Nos estudos dos efeitos do álcool sobre o cerebelo, realizados neste Instituto com o modelo experimental de alcoolização utilizado no presente trabalho, foi verificado que a redução do número de células e do volume das camadas se acentuava à medida que os períodos de consumo de álcool se prolongavam (290,292,298,300).

Os resultados dos trabalhos de Walker e col. no Murganho (345,346,348) apontam redução de aproximadamente 16% nas células piramidais de CA1 e de cerca de 20% nas células granulares, após 5 meses de alcoolização seguidos de 2 meses de abstinência. Também no Murganho, e num modelo em que a alcoolização era igualmente seguida de abstinência, Lescaudron e Verna (168) concluem por redução um pouco inferior nas células piramidais de CA1. Assim, surge a dúvida sobre se tais reduções numéricas avaliadas após períodos de abstinência de 2 e 4 meses (168,345,348) serão consequência directa da acção do álcool, tal como têm sido consideradas, ou se aos efeitos do etanol se acrescentam os provocados pela abstinência.

Supõe-se ser legítimo levantar esta dúvida tanto mais que Phillips e Cragg (240), utilizando um modelo que permite individualizar os efeitos da alcoolização dos provocados pela abstinência, encontram uma redução de 9% nas pirâmides de CA1 após 4 meses de abstinência, sem que o seu número houvesse variado significativamente após igual período de alcoolização.

Emerge do que se descreveu ser grande a contradição entre os resultados existentes na literatura sobre a atribuição da presença de morte celular aos efeitos da alcoolização ou da abstinência. Os resultados apresentados neste estudo esclarecem de modo definitivo esta questão, já que se há alterações indiscutivelmente devidas à acção do etanol, também as há que, sem margem para dúvidas, são provocadas pela abstinência após períodos experimentais prolongados. De facto, tanto as células granulares da FD como as células piramidais de CA3 sofrem acentuada redução do seu número após períodos prolongados de alcoolização e, além disso, no caso das células granulares, tal redução agrava-se após a abstinência, como foi já descrito no hipocampo e no cerebelo (240,241).

Estes resultados confirmam que a actuação do álcool sobre a FH tem repercussões diferentes conforme a população neuronal considerada. As células granulares da FD, tal como acontecia com as suas homónimas do cerebelo (290,292), constituem a população celular mais afectada pela alcoolização crónica. Embora também as células piramidais de CA3 sejam sensí-

veis à acção do etanol, a sua redução numérica não se agrava durante a abstinência, enquanto que a morte das células granulares se acentua após a supressão do álcool. Idêntica diferença de vulnerabilidade das populações celulares foi já demonstrada entre as células piramidais de CA3 e de CA1 em diversas situações experimentais (106,131) - incluíndo a sensibilidade ao álcool (345) -, nas quais foi verificado que as pirâmides de CA3 eram afectadas em menor grau. Outros autores, em estudos de isquemia cerebral transitória, verificaram que as células de ambos os campos CA3 e CA1 respondiam inicialmente de forma idêntica embora a evolução desta resposta fosse diferente (236).

Como as células piramidais de CA1 não foram estudadas no presente trabalho, não foi possível comparar as repercussões da alcoolização crónica e da abstinência entre as pirâmides de CA3 e de CA1 do hipocampo. Nesta perspectiva, a contagem das pirâmides de CA1 nestas circunstâncias experimentais teria possibilitado explicar morfologicamente as alterações funcionais descritas em estudos electrofisiológicos realizados naqueles campos após exposição prolongada ao etanol (201,270). No entanto, o estudo das pirâmides de CA1 não foi efectuado pelo facto desta população não pertencer às parcelas do circuito nervoso cuja quantificação é objectivo deste trabalho.

O conceito proposto por alguns autores de que as alterações morfológicas provocadas no SNC pelo álcool etílico são, pelo menos em certa medida, reversíveis pela abstinência (52,54,186) não coincide com os resultados quantitativos apresentados e com as observações qualitativas ultrastruturais que mostraram fenómenos degenerativos de intensidade crescente com a duração do período experimental incluindo a abstinência. Os presentes achados estão de acordo com as reduções numéricas observadas nas células piramidais de CA1 e suas sinapses após alcoolização e abstinência (240) e apoiam os resultados dos estudos psicométricos efectuados em animais abstinentes após períodos de tratamento pelo álcool, nos quais não se verificou recuperação nas respostas a diversos testes (346).

Verificada a redução numérica de ambos os tipos celulares estudados teria sido útil analisar as arborizações dendríticas dos neurónios que resistiram à acção do álcool. No entanto, tal não foi possível no caso das pirâmides de CA3 pois era insuficiente o número de células com impregnação argêntica de qualidade, necessária à satisfação dos critérios exigidos pela metodologia empregue neste trabalho. Acresce ainda o facto de a variabilidade morfológica das excrescências dendríticas destas células, onde se estabelecem os contactos sinápticos com os terminais dos axónios das células granulares, não permitir a definição de critérios uniformes de avaliação quantitativa que facultassem a comparação entre os diferentes grupos estudados.

Teve-se assim que limitar o estudo do material impregnado pela prata às arborizações dendríticas, e respectivas espinhas, das células granulares para se averiguar o tipo de alterações evidenciadas na sua organização na presença de morte celular após períodos prolongados de consumo de álcool e após abstinência.

É na camada molecular, e sobre porções distintas das arborizações dendríticas das células granulares, que terminam as principais aferências que, de proveniências diferentes e seguindo trajectos diversos, atingem a FD. Assim, os terminais das fibras dos neurónios entorrinais homolaterais (via perfurante) estabelecem contactos sinápticos com os segmentos dendríticos situados nos três quartos ou dois terços externos da camada molecular (13,150,178,179), enquanto que as porções dendríticas restantes recebem as aferências veí-

culadas pelas fibras comissurais do hipocampo contralateral e as de associação do hipocampo homolateral (13,150,178,179); além destes tipos de aferência um outro, constituído pelas fibras septais, distribui-se por toda a espessura da camada molecular com predomínio na sua porção mais interna, isto é, próxima dos somas das células granulares (13,150,178,179). Esta geometria das aferências sobre as arborizações dendríticas das células granulares esteve em mente ao efectuarem-se as observações qualitativas deste elo do circuito trissináptico da FH e na escolha do local onde se realizou a avaliação dos parâmetros quantitativos.

O estudo qualitativo das árvores dendríticas das células granulares não pôs em evidência qualquer modificação nos grupos alcoolizados e abstinentes em relação aos respectivos controlos. No entanto, a análise quantitativa dos seus parâmetros métricos nos animais alcoolizados mostrou aumento da extensão dendrítica por célula; esta variação, dependente quer do tempo de experiência quer dos efeitos do álcool, justifica a inexistência de alterações significativas na espessura da camada molecular na qual se estendem os dendritos das células granulares.

Este aumento do comprimento dendrítico mostra que, tal como acontece noutras circunstâncias (48,60,107), estas células mantêm as suas potencialidades plásticas em animais com considerável tempo de vida (20 meses), as quais não são inibidas, mas pelo contrário exacerbadas, após o consumo de álcool. A proliferação da área receptora das células sobreviventes à acção do etanol muito provavelmente será consequência da diminuição de tecido dendrítico disponível após a morte de grande número de células granulares, representando uma resposta compensadora dos défices estruturais ocasionados pela perda neuronal. Tal hipótese tem cabimento já que tem sido constatado que o SNC mantém as suas potencialidades plásticas durante o consumo crónico de álcool (160,186,296,299,301) e por isso fica reforçada a interpretação de que a diminuição de tecido dendrítico resultante da redução do número de células granulares possa ser parcialmente compensada pelo crescimento das células sobreviventes.

Os estudos de Riley (249) e de Riley e Walker (250) após 5 meses de alcoolização revelaram não haver alterações das arborizações das células granulares; tal discordância em relação aos presentes resultados pode ser explicada pelo facto de não só as quantificações terem sido realizadas pelo método de Sholl (269) como ainda por o período de alcoolização ser seguido de 8 semanas de abstinência . A este respeito há que ter em mente que estudos electrofisiológicos efectuados nas mesmas condições experimentais (2,3,4) apontam para a existência de evidentes potencialidades plásticas no funcionamento da área denteada no Rato submetido a alcoolização crónica (4), apesar da inexistência de suporte morfológico subjacente a essas modificações funcionais.

Contrariamente ao observado nos grupos alcoolizados, após abstinência verificou-se empobrecimento das arborizações dendríticas traduzido por diminuição tanto do comprimento dendrítico total como da distância radial, acompanhada de redução dos valores dos restantes parâmetros métricos em relação aos animais alcoolizados durante 18 meses. Tais reduções eram ainda acompanhadas por diminuição da espessura da camada molecular. Embora de modo especulativo é de admitir que a regressão das arborizações dendríticas das células sobreviventes à acção do álcool possa estar relacionada com as novas condições metabólicas criadas pela supressão do etanol. Tal hipótese é, no entanto, controversa pois os achados de McMullen e col. (186) em material impregnado pela prata apontam para a existência de plasticidade dendrítica nas células piramidais de CA1 num modelo no qual após 5 meses de alcoolização havia apenas 2 meses de abstinência.

Os resultados quantitativos referidos apontam ainda para aumento da extensão das árvores dendríticas das células granulares nos animais dos grupos controlos à medida que as

suas idades avançam e são concordantes com os apresentados por outros autores em roedores (66,68) e em primatas (78) incluindo o Homem (47,107,108), igualmente relacionados com o decurso da idade. Além disso, nos animais alcoolizados as árvores dendríticas das células sobreviventes mantêm esta capacidade plástica durante os diferentes períodos experimentais. Contudo, nos animais sujeitos a abstinência há empobrecimento das arborizações das mesmas células, o que está de acordo com os resultados encontrados por diferentes autores nesta e noutras áreas do SNC de roedores (170,251), do Macaco (309) e do Homem (108) com idades avançadas, em relação a outros menos idosos. Em resumo, a análise conjunta do comportamento das árvores dendríticas das células granulares nos animais com a mesma idade - controlos, alcoolizados e abstinentes - sugere que a supressão do álcool provoca alterações semelhantes às previsíveis em animais de idade mais avançada. Este tipo de comportamento dendrítico está de acordo com as observações realizadas neste Instituto no cerebelo (217) e pode ser interpretado como sinal de envelhecimento precoce (217).

As referidas modificações dos parâmetros métricos da geometria dendrítica das células granulares não se acompanharam, durante todo o período experimental, de variações significativas na densidade das suas espinhas, embora o consumo crónico do álcool em outras populações neuronais provoque marcadas modificações de índole quer degenerativa quer plástica nestas formações (300,345), traduzidas em variações do seu número ou do seu comprimento (299). Na FH, os resultados encontrados por outros autores não são concordantes. Se Riley e Walker (250), utilizando o método de Golgi, apontam diminuição das espinhas dendríticas quer nas células granulares da FD quer nas arborizações basais das células piramidais de CA1, Kunz e col. (160) referem aumento do seu número nestas arborizações e Lee e col. (165), com métodos ultrastruturais, não encontraram redução na densidade das espinhas dos dendritos apicais destas pirâmides; por isso estes últimos autores (165), ao levarem em conta os resultados de Riley e Walker (250), formulam a hipótese de os dendritos basais serem mais sensíveis ao álcool que os apicais.

No presente estudo, e apesar da inexistência de variações significativas na densidade das espinhas dendríticas das células granulares nos animais alcoolizados, se atendermos ao aumento do comprimento dendrítico total verificado nestas células pode prever-se que o número total de espinhas, por célula, esteja aumentado. Embora na abstinência também não se tivessem verificado variações significativas da densidade de espinhas, a redução da extensão das arborizações dendríticas determina redução do número de espinhas por célula. Tal facto contribui para a diminuição da área receptora da arborização dendrítica para as aferências entorrinais, comissurais e septais que a atingem e consequente redução da capacidade receptora destes neurónios àquelas aferências já que, de acordo com Peters e Feldman (228), 85% das sinapses dos neurónios corticais estabelecem-se nas espinhas dendríticas.

As repercussões funcionais desta redução, durante a abstinência, da área receptora das células granulares para as diferentes aferências, e a consequente diminuição do teor das suas eferências, poderão traduzir-se de modo semelhante às verificadas na demência de Alzheimer; nesta doença, as alterações mnésicas e comportamentais são atribuídas ao chamado "isolamento" da FH em virtude da quantidade das aferências que a atingem e das eferências que dela partem, estar francamente diminuída (143).

Apesar das alterações verificadas nos parâmetros métricos das arborizações dendríticas das células granulares após alcoolização crónica e abstinência, a análise topológica destas árvores não permitiu detectar diferenças na disposição dos seus segmentos dendríticos em todos os grupos estudados. Esta conclusão baseia-se na análise dos gráficos dos contornos de

verosimilhança, nos quais as áreas de significância apresentavam zonas de sobreposição nos diferentes grupos.

O crescimento dendrítico observado nos grupos alcoolizados durante 6 e 18 meses e a regressão encontrada nos animais do grupo de abstinência 2 ocorreram sem alterações significativas do arranjo básico dos ramos cuja organização se ajusta ao modelo de "crescimento" terminal. Para além disso, os segmentos proximais das arborizações destas células apresentavam maior probabilidade de ramificação que os distais, tal como sucede noutras populações neuronais do SNC (316,327).

Tendo em conta os resultados dos efeitos da alcoolização crónica e da abstinência sobre a FH, acima discutidos, e ainda os fornecidos pela observação ultrastrutural do neurópilo do estrato lúcido, verifica-se que a par dos sinais degenerativos havia outros que traduziam a presença de actividade plástica.

Assim, a diminuição dos valores da densidade volumétrica dos TFM após 6 e 12 meses de alcoolização pode ser interpretada como consequência directa da redução do número de células granulares verificada durante aqueles períodos experimentais. Contudo, a inexistência de variações significativas dos valores desta densidade após 18 meses de consumo de álcool e a abstinência - apesar da acentuação da morte das células granulares - é importante indicador de actividade plástica nesta área, uma vez que deixa de verificar-se diminuição do compartimento pré-sináptico do neurópilo em questão, como até então acontecia. Este facto pode depender da actividade proliferativa dos botões manifestada tanto pelo aumento do seu número (164,281) como pelo do volume dos terminais que não degeneraram, ou até à associação dos dois processos.

Dadas as manifestas potencialidades plásticas evidenciadas pelos complexos sinápticos em múltiplas situações experimentais (5,14,28,70,86,149,281,296), impunha-se fazer o estudo sinaptológico desta área, nomeadamente o das sinapses entre os TFM e as células piramidais de CA3; não só porque constituem o elo fundamental do circuito trissináptico da FH mas também pelo facto de serem sensíveis ao álcool durante o seu desenvolvimento (354,355).

Curiosamente, a determinação do número destas sinapses por unidade de volume de estrato lúcido revelou uma diminuição de 23% somente após 18 meses de alcoolização e que passava para 26% no grupo de abstinência após 12 meses de ingestão de álcool relativamente aos controlos da mesma idade, embora as reduções do número das células granulares e piramidais se verificassem a partir dos 6 meses de tratamento pelo etanol.

Porém, não se podem esquecer as já tão referidas potencialidades plásticas desta área que explicariam a inexistência de variações significativas do número de sinapses do estrato lúcido aos 6 e 12 meses de alcoolização. É lícito pensar-se que tal facto se deva à formação de novas sinapses que deste modo contribuiriam para a normalização funcional deste circuito nervoso. Tal não se verificaria aos 18 meses de alcoolização por falência de resposta reorganizativa.

Não deixa de ser surpreendente a ausência de variação do N_v sináptico dos grupos submetidos a 6 e 12 meses de tratamento pelo álcool. Na verdade, num circuito nervoso altamente prejudicado pela redução do número de células cujos axónios vão formar terminais que estabelecem contactos sinápticos com elementos dendríticos de outro tipo de neurónios cujo número também se encontra reduzido, seria de esperar que o número de sinapses por unidade de volume do neurópilo em causa se encontrasse significativamente reduzido, como sucede aos 18 meses de alcoolização.

A hipótese de formação de novas sinapses teria maior consistência se, tal como se

procedeu na camada III do córtex prelímbico, tivesse sido possível determinar a relação sinapse/neurónio num mesmo volume de estrato lúcido. Como se desconhece o número de excrescências dendríticas por célula piramidal de CA3 e o número de terminais por fibra musgosa de cada célula granular, realizou-se outro tipo de cálculo cuja aplicação é de rigor discutível, pelo que não se incluíu no capítulo "Resultados", mas que se apresenta unicamente como contributo para reforço da demonstração da existência de plasticidade sináptica nos grupos de animais alcoolizados durante 6 e 12 meses. Tal cálculo consistiu em relacionar o N_v das sinapses entre os TFM e as células piramidais de CA3 com o N_v quer das células granulares - origem dos componentes pré-sinápticos - quer das pirâmides de CA3 - cujos dendritos constituem os elementos pós-sinápticos. Os resultados obtidos mostraram aumento significativo destas relações nos dois grupos de animais alcoolizados quando comparados com as dos controlos da mesma idade.

Tais resultados, mesmo encarados com a indispensável reserva, podem não só apontar no sentido da valorização da existência da plasticidade sináptica referida - descrita na FH em diferentes circunstâncias experimentais (70,281) - como ainda indicar a participação dos componentes pré- e pós-sináptico das junções do estrato lúcido nos fenómenos plásticos.

Mesmo não levando em conta os resultados obtidos neste tipo de cálculo baseado em quantificações efectuadas separadamente em diferentes elementos do circuito neuronal da FH, um outro dado directo da capacidade plástica destas sinapses decorre da determinação da fracção de membrana dos TFM ocupada por zonas activas, índice sináptico utilizado por outros autores (12) como parâmetro de caracterização morfológica de maturação sináptica. Os resultados obtidos mostraram aumento significativo daquela fracção a partir dos 6 meses de alcoolização e que se acentuava na abstinência em relação aos controlos da mesma idade, nos quais os valores encontrados são muito próximos dos apontados por Amaral e Dent (12) nesta população sináptica da FH de animais adultos.

Esta maior extensão sináptica mostra que, além do presumível aumento do número de sinapses do estrato lúcido por célula granular, os terminais dos axónios destas células dispõem de maior extensão de zonas activas durante a alcoolização e a abstinência. Este aumento, que em termos funcionais poderá ocasionar acréscimo na capacidade sináptica nesta região (86), constitui uma alternativa de compensação estrutural para preservar relativamente constante a área de contacto sináptico e, consequentemente, restabelecer a normalização do circuito trissináptico. Tal tipo de compensação sináptica foi já descrito no SNC não só em situações nas quais se verificava redução do número de sinapses (70,135) como também no cerebelo após alcoolização crónica, no qual, a par de diminuição do número de sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje, foi descrito aumento da extensão daquelas sinapses (290,301).

Tais factos confirmam a existência de relação inversa entre o número de contactos sinápticos e o tamanho das suas zonas activas (5,70,135) e, além disso, que as junções sinápticas não são intervenientes passivos perante as modificações verificadas nos seus componentes pré- e pós-sináptico (301) pela acção do álcool e sua supressão, pois revelam combinação complexa de alterações degenerativas e de manifestações plásticas.

Resumindo, os resultados dos efeitos da alcoolização e da abstinência prolongadas sobre a organização neuronal da FH, atrás discutidos, permitem extrair algumas conclusões com importante repercussão funcional sobre este elo do circuito trissináptico desta área do SNC.

Durante a alcoolização crónica, a redução do número de células granulares da FD e de células piramidais de CA3 exprime as consequências finais de índole degenerativa provocadas pelo consumo prolongado do álcool; tais reduções numéricas, resultantes de morte neuronal, justificam, por si só, consequências de natureza deficitária no funcionamento do circuito da FH já que a conectividade neuronal desta região passa a estar altamente afectada.

No entanto, ainda durante a alcoolização, as células granulares que sobreviveram à acção do etanol exibem aumento da extensão das arborizações dendríticas e do número total de espinhas por célula, aumentando deste modo a sua superfície receptora.

Como seria de esperar, também as sinapses entre as FM e as células piramidais de CA3 são afectadas pela acção do álcool etílico. Se até aos 12 meses de alcoolização a inexistência de alterações significativas nos valores da sua densidade numérica pode traduzir actividade plástica, aos 18 meses de tratamento pelo etanol os valores encontrados fazem pensar em falência ou esgotamento desta capacidade. No entanto, o facto de a fracção de membrana dos TFM ocupada por zonas activas aumentar a partir dos 6 meses de alcoolização demonstra que as sinapses do estrato lúcido respondem também plasticamente à actuação do etanol, tentando restabelecer a área sináptica total e consequentemente contribuir para a normalização funcional deste elo sináptico do circuito da FH.

No respeitante à abstinência, pode dizer-se que, de modo geral, há agravamento das alterações morfológicas verificadas durante a alcoolização. Na verdade, além da redução da densidade numérica das células granulares ser mais acentuada, cada uma das que sobreviveram à acção do etanol apresenta regressão da extensão da sua arborização dendrítica e, consequentemente, menor número total de espinhas. Por isso, as aferências que com diferentes origens atingem a camada molecular da FD encontram um campo receptor ainda mais reduzido que durante a alcoolização. Se tal facto condiciona, por si só, défice funcional no início do circuito neuronal da FH, haverá que acrescentar-lhe ainda as consequências da diminuição das eferências partidas das células granulares para as células piramidais de CA3 cujo número, por outro lado, se mantém reduzido. Embora se desconheça o comportamento dos dendritos destas células perante os efeitos do consumo crónico do álcool e da sua supressão, verifica-se que a densidade numérica das sinapses do estrato lúcido se mantém reduzida.

No entanto, estas sinapses exibem ainda potencialidades plásticas já que a fracção de plasmalema dos TFM ocupada por zonas activas sofre aumento em relação ao verificado durante a alcoolização. Deve salientar-se, finalmente, que este achado é o único sinal de reorganização estrutural verificado após a supressão do etanol visto que, durante a abstinência, as quantificações dos restantes elementos estruturais do circuito neuronal da FH estudados comprovam os dados recolhidos na observação qualitativa que apontavam para agravamento dos fenómenos degenerativos nos animais abstinentes em relação aos alcoolizados.

4. CÓRTEX PRELÍMBICO

Os resultados do estudo dos efeitos do consumo crónico do álcool e sua supressão sobre a organização estrutural da área prelímbica (PL) do córtex prefrontal medial (CPFm) do Rato confirmaram, na generalidade, as alterações morfológicas que atrás se referiram na formação do hipocampo (FH) e as previamente observadas neste Instituto de Anatomia, tanto no cerebelo (216-218,224,290,292-294,296-303) como na FH (36,221), e as de outros autores nas mesmas regiões do encéfalo de roedores (238,240,241,345,348).

Embora na FH se tivesse verificado certo grau de correspondência entre os dados

fornecidos pela observação qualitativa e os resultados obtidos nos diferentes tipos de quantificação realizados - que no caso do cerebelo era ainda mais evidente (216,217,290-292,294,295, 297,298,300-302) -, na análise dos efeitos da alcoolização crónica sobre o córtex prefrontal (CPF), à escassez das alterações qualitativas opunha-se um conjunto de dados quantitativos - número de células e de sinapses - que evidenciavam acentuadas modificações estruturais nos elementos dos respectivos circuitos nervosos. Durante a abstinência esta disparidade acentuava-se ainda mais já que aquelas modificações quantitativas se agravavam em relação às verificadas durante a alcoolização.

Não se conhece, na literatura consultada, qualquer referência a estudos qualitativos ou quantitativos dos efeitos quer da alcoolização crónica quer da abstinência sobre a organização estrutural do córtex da área PL. Aliás, é de referir que, embora o CPFm, como se disse, esteja envolvido em importantes funções cognitivas essencialmente relacionadas com a memória e a aprendizagem (154,155,190,205,246,261) e possuindo conexões com o sistema límbico (154,246) não são, contudo, muito numerosos os trabalhos de índole morfológica centrados nesta área (28,103,246,252). No que ao álcool diz respeito é ainda de referir que os estudos morfológicos experimentais acerca dos seus efeitos sobre o córtex cerebral são em número muito reduzido , em relação aos realizados noutras áreas do SNC, pese embora a homologia funcional e comportamental deste manto cortical com o córtex prefrontal humano. Tanto quanto se sabe, aqueles estudos limitam-se à observação de vacuolização dendrítica (121), à verificação de fenómenos degenerativos com redução do número de espinhas dendríticas e reacção glial (242) e, no córtex parietal, à descrição da presença de corpos de inclusão nuclear (339) que haviam sido já assinalados no cerebelo em observações realizadas neste Instituto (291). Ainda no córtex parietal, mas em estudos de alcoolização pós-natal, Jones e Colangelo (148, 149) referiram alterações na maturação sináptica. Por outro lado, Rutledge e col. (258,259) não encontraram justificação morfológica convincente para os efeitos do etanol sobre a actividade inibitória neocortical que demonstraram electrofisiologicamente (258).

Os resultados obtidos com o presente modelo experimental evidenciaram redução do número de neurónios por unidade de volume da camada III do córtex PL nos animais alcoolizados desde os 6 meses, embora só significativa a partir dos 12 meses de alcoolização. Este achado confirma claramente que a morte neuronal é uma manifestação generalizada da agressão do álcool sobre o SNC, tanto mais que aquela redução da densidade numérica era acompanhada de diminuição da espessura das camadas corticais e por isso deverá corresponder a redução do número total de neurónios (234).

Em relação à morte celular, e a exemplo do sugerido a propósito da FH, também no caso do CPF se pode inferir que a morte neuronal ocorre progressivamente e de modo distribuído ao longo do tempo de experiência, dada a pouca frequência de perfis degenerados observados. No entanto é possível concluir que, no córtex PL, é no período entre os 6 e os 12 meses de alcoolização - ausência de diferença significativa no número de neurónios aos 6 meses e presença aos 12 meses - que se verifica agravamento da actividade degenerativa, o que traduz a existência de diferentes limiares na vulnerabilidade que as diversas áreas do SNC apresentam perante a alcoolização crónica.

Esta maior resistência aos fenómenos degenerativos na área PL não significa que os efeitos do álcool se não fizessem sentir já desde o início da experiência. De facto, a partir dos 6 meses encontraram-se alterações do compartimento lisosómico dos neurónios desta área cortical, traduzidas por aumento da deposição de lipofuscina e presença de corpos multivesiculares (49). A deposição precoce e progressiva de lipofuscina havia já sido verificada nas células pira-

midais de CA1 e CA3 da FH (36,37) e também nas células de Purkinje e nos interneurónios do cerebelo (217,294,303), áreas do SNC nas quais a morte celular tem expressão significativa mais precoce (290,292,300). Ainda no respeitante aos valores da densidade numérica dos neurónios do CPF, verificou-se que a sua redução nos grupos de animais alcoolizados se acentuava ao longo do tempo de experiência; por outro lado, não havia variações significativas do número de células nos animais dos diferentes grupos de controlo. A ausência de variação destes números em animais com idades compreendidas entre 8 e 20 meses está de acordo com os actuais conceitos sobre a inexistência de perda neuronal no córtex cerebral do Rato pelo menos até aos 33 meses (61,79,80,234); contudo a aceitação deste conceito é polémica pois outros autores referem diminuição do número de neurónios corticais no Rato com o avançar da idade (42,209), conforme está comprovado que sucede tanto no Homem (44,141,305) como no Macaco (42,43). Em extensa revisão sobre esta matéria, Coleman e Flood (61) sugerem que as referidas discrepâncias encontradas por diferentes autores nos roedores e entre estes e os primatas poderão ser consequência de divergências no estabelecimento do limite a partir do qual se considera o animal como velho.

No respeitante aos grupos submetidos a abstinência após consumo prolongado de álcool, também se verificou redução do número de neurónios do CPF em relação aos controlos da mesma idade. No entanto, e ao contrário do verificado na FH, só no grupo de abstinência 2 se pode concluir que haja acentuação da perda celular. O agravamento da morte neuronal no CPF após a supressão do álcool coincide com o que se descreveu nas células granulares da FD e com as observações de Phillips e Cragg (241), que mostraram redução de 22% do número de células de Purkinje no cerebelo do Murganho aos 4 meses de abstinência após igual período de alcoolização.

Também no córtex PL se procurou averiguar o comportamento das arborizações dendríticas das células piramidais perante a redução do número de neurónios provocada pela alcoolização e pela abstinência. Pelas razões atrás expostas, este estudo foi levado a cabo exclusivamente nas arborizações basais. Apesar das reservas que esta limitação acarreta verificou-se, tal como para as células granulares da FD, não haver diferenças qualitativas entre os animais dos grupos estudados. No entanto, a análise quantitativa revelou a existência de alterações significativas nos parâmetros métricos no grupo de abstinência estudado (abstinência 2), quando comparado com o grupo controlo com a mesma idade.

Tal como acontecia com as árvores dendríticas das células granulares da FD, as arborizações basais das células piramidais do córtex PL mostraram aumento de extensão com o decurso da idade quer nos animais controlos quer nos alcoolizados, dependente de variações dos parâmetros métricos gerais e da quase totalidade dos referentes aos segmentos. Este aumento da extensão dendrítica com o avançar da idade processou-se sem variações significativas entre animais alcoolizados e controlos da mesma idade, ao contrário do verificado nas células granulares da FD, e por isso não pode ser atribuído aos efeitos do consumo do álcool.

A discussão sobre as variações da extensão dendrítica destes neurónios corticais com a idade envolve considerações quase sobreponíveis às desenvolvidas acima a propósito da influência da idade sobre o número de neurónios. Na verdade, e no respeitante aos roedores, o aumento verificado está de acordo com os resultados de outros autores (66-68) mas em contradição com os que demonstraram empobrecimento destas arborizações com o decurso da idade (99,328). Esta discrepância de opiniões é extensível aos estudos realizados em primatas, incluindo o Homem, pois se alguns investigadores mostram haver diminuição com o avançar da

idade (200,266,267) outros defendem a existência de aumento até certo nível etário, seguido de regressão na "velhice" (47,78,309).

Embora Buell e Coleman (46,47) interpretem o aumento da extensão dendrítica com a idade como fenómeno de compensação regenerativa em resposta à diminuição do número de neurónios, tal hipótese não se adapta ao caso presente pois verifica-se estabilidade no número de neurónios com o decurso da idade; por isso sugere-se, de acordo com Diamond e col. (89), que o "crescimento" em causa poderá corresponder à manutenção da actividade plástica dos dendritos corticais ao longo de toda a vida. Acrescente-se, ainda, que para Coleman e Flood (61) as divergências entre os resultados acima referidos podem atribuir-se a diferenças existentes entre as espécies estudadas e, em cada espécie, entre as áreas analisadas, variáveis às quais acrescentam ainda o emprego de metodologias diferentes pelos diversos autores.

A hipótese de Coleman e Flood (61) sobre a diversidade de comportamento das diferentes regiões do SNC no decurso da idade é apoiada pelos resultados obtidos para as populações neuronais estudadas no presente trabalho; na verdade, apesar da perda celular verificada tanto na FH como no CPF, as árvores dendríticas das células granulares e as arborizações das células piramidais da área PL reagiram de modo diferente aos efeitos da alcoolização prolongada.

É no entanto curioso verificar-se que nos animais do grupo abstinente estudado havia diminuição da extensão dendrítica daquelas células piramidais em relação às dos animais controlos e alcoolizados da mesma idade e que também as células granulares da FD mostravam aquela mesma regressão após a supressão do álcool; como em ambas as áreas a redução do número de neurónios se acentuava nos animais daquele grupo abstinente, é de supor que as diferenças regionais referidas acima deixem de se manifestar após supressão do álcool. Esta hipótese é confirmada pelo facto de os animais abstinentes terem a mesma idade que os alcoolizados durante 18 meses e respectivos controlos; por isso a redução da extensão dendrítica observada no grupo abstinente não pode estar relacionada com a idade e dependerá exclusivamente dos efeitos da supressão do etanol após 12 meses de alcoolização.

A redução do comprimento dendrítico total verificada nas células piramidais dos animais sujeitos a abstinência em relação aos respectivos controlos era devida à diminuição do número médio de dendritos nascidos do corpo celular e consequente redução do número total de segmentos.

Para esclarecer se estas alterações eram acompanhadas de modificações nas relações dos parâmetros entre os dendritos remanescentes, procedeu-se ao estudo individual dos segmentos; assim, verificou-se a existência de redução significativa do comprimento dos segmentos intermediários que originavam segmentos terminais (tipo itt) e aumento do comprimento dos que se dividiam noutros segmentos intermediários (tipo iii); por outro lado, não se verificaram variações nem do comprimento dos segmentos terminais nem da distância radial. Além disso, o número de segmentos intermediários de cada um dos dois tipos referidos (itt e iii) estava diminuído em relação ao dos controlos da mesma idade.

A manutenção dos valores da distância radial associada a esta diminuição do número de segmentos só poderá ter duas interpretações: ou significar que os segmentos que lhes davam origem se estenderam por maior distância por perda dos segmentos "filhos" ou ser resultante de "crescimento real" consequente a "crescimento" intrasegmentar como foi já descrito nas células granulares da FD após deaferenciação (48,281). Esta demonstração de plasticidade dendrítica dos neurónios corticais sobreviventes à acção do etanol tem ainda apoio no aumento do comprimento dos segmentos do tipo iii.

As considerações acima desenvolvidas sobre os resultados da análise dendrítica das

células piramidais que sobreviveram aos efeitos da alcoolização e abstinência prolongadas - que provocam franca e progressiva morte neuronal durante todo o período experimental -, permitem extrair duas conclusões. A primeira é que, durante a alcoolização, aqueles efeitos afectam os neurónios de modo tão pronunciado que estes morrem, sem que seja possível detectar nas células sobreviventes variações na sua extensão dendrítica. A segunda conclusão é que, na abstinência, além daquele efeito letal as células piramidais que resistiram mostram redução do seu comprimento dendrítico total, fenómeno degenerativo que não será suficientemente compensado pela actividade plástica manifestada pelo aumento, acima referido, do comprimento dos segmentos intermediários. Tais conclusões permitem inferir que, durante a abstinência, também no CPF surgem novas condições que dão origem ao agravamento das alterações dos elementos morfológicos dos circuitos nervosos, já verificadas durante a alcoolização.

Tendo em conta o papel desempenhado pelas espinhas dendríticas na área receptora total dos neurónios, estava indicado também o seu estudo nas presentes circunstâncias experimentais. Além da observação qualitativa dos dendritos quer basais quer apicais não ter evidenciado alterações nos grupos alcoolizados e abstinentes em relação aos controlos, também os valores das suas densidades nos dendritos basais não mostraram variações entre os diferentes grupos estudados. Embora as quantificações se tivessem realizado nos dendritos que haviam sido sujeitos a análise métrica, contagens realizadas em alguns dos dendritos apicais das mesmas células também não revelaram variações daquela densidade em nenhum grupo.

A manutenção da densidade das espinhas dendríticas nas células piramidais do CPF está em desacordo com as reduções verificadas nas células de Purkinje do cerebelo do Rato (300) e nos neurónios piramidais do córtex frontal do Homem (105,293) em situações de consumo crónico de álcool. Esta diversidade de comportamento, que tanto no caso presente como nos daqueles autores (105,293,300) é acompanhada de morte neuronal, constitui mais um contributo a favor da hipótese da integridade estrutural das células sobreviventes à acção do etanol no CPF do Rato, pois tanto no cerebelo deste animal (300) como no córtex frontal humano (105,293), havia empobrecimento das arborizações dendríticas.

Embora na abstinência também não se tenha verificado variação da densidade de espinhas, a redução do comprimento dendrítico total das células piramidais nesta situação experimental acarretará diminuição do número total de espinhas por célula, facto que contribui para maior redução da área receptora total destes neurónios; tal como se verificou nas células granulares da FH durante a supressão do álcool, também no CPF este facto será mais um factor a considerar na análise das consequências morfofuncionais de natureza degenerativa decorrentes das condições criadas pela abstinência.

Apesar das alterações verificadas nos parâmetros métricos das arborizações basais das células piramidais da camada III do córtex PL durante a abstinência, a análise dos gráficos dos contornos de verosimilhança mostrou que, em todos os grupos estudados, as áreas de significância apresentavam zonas de sobreposição. Por outro lado, a regressão da extensão dendrítica encontrada nos animais abstinentes ocorreu sem alterações significativas do arranjo básico dos ramos cuja organização corresponde, em todos os grupos estudados, ao modelo de "crescimento" terminal descrito por outros autores em dendritos basais de células piramidais (316). Estes elementos colhidos na análise topológica coincidem com os observados nas células granulares da FD e permitem concluir que não há diferenças na disposição dos segmentos dendríticos nas árvores estudadas e que os segmentos proximais apresentam maior probabilidade de ramificação que os distais, como tem sido verificado neste e noutros tipos neuronais do SNC (316,327).

A redução neuronal e as modificações dendríticas descritas são complementadas por outras alterações degenerativas a nível ultrastrutural no neurópilo da camada III deste córtex, de modo idêntico ao observado e descrito no neurópilo do estrato lúcido da FH e das camadas granular e molecular do córtex do cerebelo (216,290,292,296,298,301), após alcoolização crónica. De facto, visualizaram-se sinais de degenerescência densa quer ao nível dos terminais nervosos quer nos dendritos das células corticais, acompanhados de proliferação glial reactiva. Embora não se tivessem observado variações quantitativas da densidade volumétrica dos terminais - tal como foi verificado com os das fibras musgosas do cerebelo (290,296) - a fracção de volume de neurópilo ocupada pelos prolongamentos gliais mostrou-se significativamente aumentada nos grupos alcoolizados e abstinentes; tal gliose reactiva, também descrita na camada granular do cerebelo durante a alcoolização prolongada (290,296), é um fenómeno morfológico que surge como resposta do SNC a agressões agudas (203) ou crónicas (290,296,297,301) e usualmente acompanha o avançar da idade (8). Como este aumento da densidade volumétrica da glia se verifica sem modificação concomitante da dos terminais axonais, é de supor que corresponda a redução do tecido dendrítico deste neurópilo, consequência aliás previsível considerando a diminuição do número de neurónios e a inexistência de alterações métricas das arborizações basais das células resistentes à acção do álcool.

As variações quantitativas acima descritas terão repercussões volumétricas na área cortical em estudo, relacionadas com a espessura das suas camadas corticais. Embora na FH a diminuição da espessura da camada granular correspondesse exclusivamente à redução do número de células por morte neuronal - já que as suas arborizações dendríticas se estendem pela camada molecular -, no caso do CPF a redução da espessura cortical poderá depender daquele efeito letal do álcool sobre os somas degenerados e também sobre as suas arborizações. Esta hipótese é corroborada pelo estudo da espessura cortical durante a abstinência, que mostra marcado paralelismo entre as alterações dendríticas e a diminuição da espessura cortical.

Considerando por um lado as alterações qualitativas verificadas nos componentes pré- e pós-sinápticos deste neurópilo e por outro os resultados de diferentes estudos que mostram que a alcoolização e a abstinência provocam degenerescência sináptica (238,240,301), formação de novas sinapses (301,302) ou alterações nas sinapses remanescentes (296,301), impunha-se uma análise detalhada dos contactos sinápticos deste neurópilo; esta atitude é ainda reforçada não só por que está demonstrado que as sinapses do CPFm são passíveis de apresentar modificações morfológicas em outras circunstâncias experimentais (28) mas também porque qualitativamente foi observada a presença frequente de contactos sinápticos perfurados, geralmente de maior extensão que a das sinapses não perfuradas, no neurópilo dos animais alcoolizados e abstinentes. Observou-se, no entanto, que os contactos perfurados se encontravam não homogeneamente distribuídos mas antes formando aglomerados em zonas dispersas e diferentemente distanciadas entre si.

As sinapses perfuradas têm sido observadas, e também quantificadas, em neurópilos de diferentes tipos e o aumento do seu número relacionado com a idade e o grau de actividade (6,51,116,126,147,341). A sua presença tem sido interpretada como manifestação de plasticidade sináptica (93,126,202,341) e tais sinapses consideradas como estrutura intermediária no processo de remodelação sináptica já que a sua cisão, com origem na perfuração, acarretaria o aparecimento de dois contactos não perfurados a partir de um perfurado (55,116,147,202).

Este mecanismo de neoformação sináptica por divisão ou cisão das sinapses perfuradas pode ser o responsável pela actividade plástica que justificaria o aumento significativo da densidade numérica das sinapses (não perfuradas e perfuradas) do neurópilo do córtex PL, verificado a partir dos 18 meses de alcoolização e que se acentua durante a abstinência.

O valor encontrado na determinação da densidade numérica destas sinapses aos 18 meses de alcoolização representa aumento do seu número absoluto por unidade de volume de neurópilo e não do valor relativo em consequência da diminuição do N_v sináptico verificado nos animais controlos da mesma idade. De facto, não só é geralmente aceite que o número de sinapses corticais no Rato se reduz com o avançar da idade (7,187,308) como os valores encontrados não se afastam muito dos apontados por outros autores (25) nas camadas II-IV da superfície dorsolateral do córtex frontal do Rato adulto, embora empregando metodologia morfométrica diferente (25).

A tradução morfológica de plasticidade sináptica foi já citada no estrato lúcido da FH e verificada no cerebelo (296, 301) nas mesmas circunstâncias experimentais e também no neocórtex após alcoolização pós-natal e abstinência (148,149). Deve salientar-se, no entanto, que o tipo de resposta plástica das sinapses do neurópilo do córtex PL perante a alcoolização e a abstinência é diferente do verificado nos contactos entre os TFM e as espinhas dendríticas das células piramidais de CA3 e do descrito previamente neste Instituto no cerebelo (297,301, 302); também neste aspecto se demonstra a existência de diferenças regionais na reacção ao mesmo tipo de agressão. Assim, no caso do neurópilo do CPF, os fenómenos plásticos traduzem-se em aumento da densidade numérica das sinapses a partir dos 18 meses de consumo de álcool, que se acentua na abstinência, não acompanhado de modificações na área média dos discos sinápticos.

Esta diversidade de resposta põe em evidência a capacidade dos neurónios de diferentes áreas responderem morfologicamente de modo diverso ao mesmo tipo de agressão.

Nem sempre é fácil interpretar a relação entre os valores das densidades numéricas dos neurónios e das sinapses quando analisados isoladamente. Por isso utilizou-se a relação sinapse/neurónio, que não depende das variações de volume da zona onde as quantificações são efectuadas e portanto não é influenciada por eventuais alterações da espessura cortical (307). Assim, encontrou-se aumento do número de sinapses por neurónio a partir do início da experiência, embora só significativo após 12 meses de alcoolização e com agravamento na abstinência. Este aumento da relação sinapse/neurónio é mais um indicador da presença de actividade plástica tendente a compensar a diminuição da área total de contactos sinápticos consequente à redução do número de células, tanto mais que não se encontraram variações quantitativas nas áreas médias dos discos sinápticos no decurso da experiência.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os primeiros estudos realizados no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto sobre os efeitos da alcoolização no SNC centraram-se na análise das alterações de diferentes elementos dos circuitos do córtex do cerebelo do Rato adulto empregando, pela primeira vez, um modelo em que a alcoolização era de longa duração. Os resultados então obtidos, para além de confirmarem os escassos achados previamente publicados por outros autores, permitiram demonstrar que as reduções volumétricas das camadas do córtex cerebeloso - fruto da diminuição do número de células e de alterações das suas árvores dendríticas e dos contactos sinápticos - tinham repercussões estruturais marcadas nos padrões de conectividade desta área (290,292,298,300,301). Estas alterações foram interpretadas como fundamento morfológico das perturbações funcionais de índole essencialmente motora dependentes do cerebelo e desde há muito observadas nos casos de alcoolismo crónico (9,334). É óbvio que a confirmação desta hipótese implicaria o recurso a estudos paralelos de natureza fisiológica e comportamental, que

ultrapassam a competência dum grupo que se dedica à investigação neuroanatómica.

Ao iniciarem-se os trabalhos conducentes à presente dissertação, tinha-se já como adquirido que tal possibilidade, embora muito contribuísse para uma mais completa valorização dos resultados que viessem a obter-se, não poderia ser posta em prática. Estava-se ciente, para além do mais, que no caso do estudo da FH se poderiam extrair ilações preciosas ao comparar os dados estruturais com múltiplos resultados funcionais e comportamentais obtidos após lesões selectivas de zonas específicas desta área do SNC. Porém, o mesmo não poderia já verificar-se com o CPF cujos padrões de conectividade e papel funcional não são tão bem conhecidos.

Existia, no entanto, outra motivação, não menos importante, para que se realizassem estes estudos. Tratava-se de avaliar os efeitos da supressão do álcool após períodos de alcoolização prolongada, não só para averiguar os efeitos da abstinência nas áreas previamente sujeitas à exposição crónica do etanol como também para esclarecer resultados controversos existentes sobre este tema.

Saliente-se desde já que, tal como havia sido verificado no cerebelo, a par dos fenómenos degenerativos consequentes à ingestão do álcool também se manifestaram outros de reorganização estrutural - com expressão diferente consoante a área em causa - dependentes das potencialidades plásticas dos neurónios se adaptarem às modificações impostas pelas transformações verificadas no seu meio.

Os fenómenos degenerativos observados na FH e no CPF durante a alcoolização traduziram-se por morte celular acentuada e consequente diminuição da espessura das respectivas camadas corticais, tal como havia sido verificado no cerebelo (290,298). Mas ao estabelecer-se comparação entre os graus de resposta degenerativa nestas três áreas ressaltou que, embora a morte celular fosse um fenómeno comum, o período de tempo que mediava entre o início da exposição ao álcool e a tradução quantitativa daquele efeito letal era maior no CPF, o que sugere a existência de diferenciação temporal na resposta a este agente neurotóxico entre o CPF, por um lado, e a FH e o cerebelo, por outro. Este facto chama a atenção, por si só, para a existência de diferenças regionais no SNC aos efeitos da agressão pelo etanol, que se fazem sentir também, e de modo mais notório, quando se avaliam aqueles efeitos sobre outros elementos morfológicos das referidas áreas. Assim, embora no cerebelo os fenómenos degenerativos, além da morte neuronal, atinjam as arborizações dendríticas das células remanescentes que se mostram diminuídas quer na sua extensão quer na densidade das suas espinhas (292,298,300), na FH e no CPF tais reduções não se verificam e, além disso, a resposta das árvores dendríticas dos neurónios estudados em cada uma destas áreas é diferente. Na verdade, se no CPF não há variações da extensão dendrítica nas células sobreviventes à acção do álcool, as arborizações das células granulares da FD apresentam aumento da sua extensão.

Mais diversa ainda é a tradução dos efeitos da alcoolização a nível sináptico. Na FH, a plasticidade sináptica verificada aos 6 e 12 meses de alcoolização é seguida de falência aos 18 meses, embora desde o início da experiência existisse aumento da extensão das zonas activas dos TFM. No CPF, pelo contrário, a partir dos 18 meses de consumo de álcool o número de sinapses está aumentado mas já aos 12 meses de alcoolização se verificava aumento da relação sinapse/neurónio. No cerebelo, a resposta sináptica assume características morfológicas diversas com expressão plástica mais notória (296,297,301,302) que a verificada na FH e ainda mais que a encontrada no CPF. Tudo se passa como que se a resposta plástica das áreas estudadas dependesse da complexidade dos respectivos circuitos neuronais: quanto mais complexos os circuitos, menores seriam as capacidades de reorganização morfológica e, obviamente, de eventual compensação funcional.

Se os efeitos da alcoolização prolongada sobre as áreas corticais estudadas se revestem de considerável interesse, são dignos de especial referência os resultados encontrados nos animais sujeitos a abstinência. E isto não só pelas conclusões que permitem inferir mas principalmente pela reflexão a que obrigam, nomeadamente em relação à busca de atitudes que possam complementar a prática da abstinência como processo de recuperação do alcoolismo crónico. Se ao Homem forem aplicáveis os efeitos da abstinência observados no SNC do Rato, seria dramática a confrontação com a necessidade de informar os alcoólicos crónicos que melhor seria não deixarem de beber para impedir o agravamento das alterações da organização estrutural do tecido nervoso; e igualmente dramático estar-se consciente que tal conselho, a ser seguido, acabaria por acentuar as lesões sobre outros orgãos da economia, nomeadamente o fígado, cuja gravidade das consequências é bem conhecida.

De facto, e de modo geral, é surpreendente verificar-se que em ambas as áreas estudadas os fenómenos degenerativos observados na alcoolização se agravam durante a abstinência alcoólica, designadamente a morte neuronal. Na FH estes fenómenos estendem-se às arborizações dendríticas das células sobreviventes à acção do etanol que revelam regressão da sua extensão, sinal indicador de que a actividade plástica ainda existente durante a alcoolização entra em declínio acentuado após a supressão do álcool. Se durante a exposição ao etanol as células resistentes à sua acção procuravam compensar o défice da área receptora total provocado pela morte celular, na abstinência tal fenómeno de compensação fica seriamente prejudicado, pois não só é mais acentuada a redução celular como as arborizações dos neurónios que sobrevivem mostram diminuição da sua extensão.

Também no CPF a acentuação da morte celular na abstinência é acrescida de fenómenos degenerativos nas células piramidais remanescentes, traduzidos por diminuição da extensão das suas arborizações dendríticas. No entanto, este empobrecimento da área receptora de cada célula não tem explicação coincidente com a sugerida para as células granulares da FD, já que durante a alcoolização não evidenciavam sinais de crescimento dendrítico embora, tal como na FD, aqui também a morte neuronal seja mais acentuada na abstinência.

No respeitante aos contactos sinápticos, a actividade degenerativa verificada durante a abstinência é acompanhada de sinais de plasticidade de tipo idêntico ao observado durante os períodos de alcoolização. Na FH estes sinais reflectem-se em aumento da extensão das zonas activas nas sinapses entre os TFM e as excrescências dendríticas das pirâmides de CA3, enquanto que no CPF é o aumento da relação sinapse/neurónio que traduz tal plasticidade. Deste modo, em ambas as áreas, embora de modo diferente, verificam-se modificações tendentes a restabelecer a área total de contacto activo entre os componentes pré- e pós-sináptico, mas na abstinência com expressão quantitativa de nível superior ao exibido durante a alcoolização.

Pese embora a presença de sinais degenerativos de intensidade variável, mas sempre de grau considerável, essencialmente expressos por morte neuronal de instalação progressiva e distribuída de modo lento ao longo de todo o período experimental, os resultados obtidos permitem ainda afirmar que tanto a FH como o CPF do Rato adulto retêm apreciáveis potencialidades plásticas, quer durante a alcoolização quer na abstinência. Estas potencialidades traduzem-se na capacidade de adaptação, pelo menos parcial, às modificações impostas pela agressão provocada não só pelo álcool como também pela sua supressão. Deve salientar-se, contudo, que embora estes processos reorganizativos funcionem, em última análise, como mecanismos compensadores da redução da área sináptica total - cuja constância é condição indispensável ao

normal funcionamento dos circuitos neuronais - tais processos nem sempre serão funcionalmente eficazes (135).

Salientou-se já que não foram avaliadas as repercussões funcionais e comportamentais dos efeitos do álcool nas áreas estudadas. Referiu-se ainda que no caso do córtex PL tal procedimento, embora difícil dada a escassez de conhecimentos morfológicos sobre esta área cortical, seria de grande utilidade tendo em vista as importantes implicações de todo o CPFm no controlo ou organização temporal do comportamento (154,193) incluindo a memória (194) e ainda as suas conexões com o hipocampo, estrutura cujas funções têm algumas semelhanças com as do CPF (154).

Já o mesmo não sucede em relação à FH pois abundam as investigações experimentais cujos resultados permitem inferir que as reduções numéricas das células granulares da FD e das pirâmides de CA3 acarretam acentuados défices funcionais e comportamentais (206,285,345). Mas há ainda controvérsia sobre esta ligação morfofuncional, já que lesões selectivas quer da FD pela colchicina (349) quer de CA3 pelo ácido caínico (131,146) provocam unicamente défices ligeiros e transitórios nas funções de memória e aprendizagem. Assim, ter-se-ia revestido de grande interesse averiguar qual o tipo, a intensidade e a duração das perturbações funcionais e comportamentais dependentes das alterações descritas nas presentes circunstâncias experimentais de alcoolização e abstinência na FH.

Seria ainda importante discutir os mecanismos subjacentes às alterações morfológicas induzidas pela alcoolização crónica e mais ainda os resultantes da supressão do álcool. Tal desiderato, no entanto, ultrapassa o âmbito deste estudo. Sabe-se, porém, não estarem neste momento esclarecidos tais mecanismos, mas provavelmente encerram uma sequência de modificações de ordem essencialmente metabólica (26,27). É de supor que o metabolismo celular se adapte às circunstâncias criadas por níveis consideráveis de álcool durante períodos de tempo prolongados e que a abstinência provoque alterações no "equilíbrio" atingido durante a exposição ao etanol. Se assim suceder, compreende-se que as modificações condicionadas pela supressão do álcool possam ser responsáveis pela mais pronunciada deterioração neuronal observada nos vários parâmetros quantitativos do SNC do Rato após períodos prolongados de abstinência alcoólica.

Ao longo de todo o presente trabalho teve-se a preocupação de estrita objectividade, evitando tecer considerações de índole especulativa. Sem que tal constitua desvio desta orientação, considera-se haver que chamar a atenção para a importância dos resultados obtidos na estratégia do combate ao alcoolismo crónico humano. De facto, face à dimensão social desta doença - preocupantemente em expansão - a verificação dos efeitos nocivos da abstinência no alcoolismo experimental no Rato não pode ser tida como mero dado de investigação pura sem implicações práticas. Há, sim, que valorizar os presentes resultados como enérgico alerta a ter em devida conta por todos quantos, a qualquer título, estão empenhados na luta anti-alcoólica.

RESUMO E CONCLUSÕES

O alcoolismo constitui um dos mais gritantes problemas de saúde pública das sociedades contemporâneas, atendendo à gravidade dos efeitos de ordem física e psíquica que provoca, aliados a altíssima e sempre crescente incidência.

Afecta de modo acentuado o SNC tendo já sido demonstradas há mais de três décadas, em alcoólicos crónicos, alterações estruturais marcadas como a atrofia cerebral. Porém, só há pouco mais de dez anos se abriram perspectivas experimentais para o estudo adequado dos efeitos do álcool sobre o SNC, ao conseguirem-se modelos animais que satisfizessem as exigências a respeitar. Deste modo os efeitos directos da alcoolização puderam ser individualizados de outras situações patológicas que habitualmente acompanham o alcoolismo crónico.

Foram pioneiros os trabalhos efectuados no Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto neste domínio. Utilizando um modelo experimental no Rato no qual os períodos de alcoolização são mais longos que os adoptados nos modelos de outros grupos de investigadores, as pesquisas centraram-se na análise das repercussões da alcoolização de longa duração sobre a morfologia do córtex cerebeloso do Rato adulto, onde se verificaram acentuadas alterações de índole degenerativa acompanhadas de transformações plásticas de carácter reorganizativo.

Nos últimos anos, e utilizando o mesmo modelo experimental, foi alargado o âmbito deste estudo à formação do hipocampo e ao córtex prefrontal, áreas estruturalmente mais complexas e funcionalmente implicadas em actividades afectivas e cognitivas superiores, nomeadamente a memória e a aprendizagem, particularmente atingidas no alcoolismo crónico. Nos neurónios destas áreas logo se encontrou aumento precoce e progressivo da deposição de lipofuscina, tal como havia sido verificado no cerebelo, acompanhado de outras alterações do sistema lisosómico, o que levou à prossecução dos estudos.

Por outro lado, é de referir que a abstinência alcoólica é uma situação cada vez mais generalizada, fruto dos avanços consecutivos na luta contra os efeitos da dependência ao consumo excessivo e prolongado do álcool. Porém, os resultados experimentais de índole morfológica obtidos nestas circunstâncias eram escassos e controversos e, na sua generalidade, não coincidentes com os dos estudos electrofisiológicos e psicométricos. Por isso se entendeu ser de grande importância aprofundar os estudos dos efeitos da abstinência, em paralelo com estudos de alcoolização, sobre as áreas do SNC referidas.

Foram utilizados grupos de ratos adultos alcoolizados durante 6, 12 e 18 meses com uma solução aquosa contendo 20% de etanol, bem como grupos de abstinência de 6 meses após períodos de 6 e 12 meses de alcoolização. Os resultados obtidos foram comparados com os de grupos de animais testemunha com as mesmas idades e nutricionalmente controlados.

Estudaram-se qualitativa e quantitativamente a formação do hipocampo e a área prelímbica do córtex prefrontal, recorrendo a cortes de material incluído em resina, impregnado pela prata e preparado para observação quer em microscopia de luz quer ultrastrutural.

A análise qualitativa dos cortes impregnados pela prata das áreas estudadas não revelou qualquer alteração da organização dendrítica dos neurónios dos animais alcoolizados e abstinentes. O mesmo não sucedeu no respeitante à análise qualitativa quer dos cortes semifinos quer dos ultrafinos. Nos primeiros, verificou-se que tanto na camada granular da fáscia denteada como na camada piramidal de CA3 havia redução do número de células nos animais alcoolizados e nos abstinentes. A observação ultrastrutural mostrou a presença de sinais de degenerescência dendrítica e axonal tanto no estrato lúcido da formação do hipocampo como no neurópilo da camada III do córtex prelímbico, acompanhada de sinais morfológicos francos de actividade reorganizativa. Esta interpretação foi reforçada no córtex prelímbico pelo aparecimento mais frequente de sinapses perfuradas e com maior extensão de contacto sináptico nos animais alcoolizados e abstinentes.

Os resultados quantitativos obtidos após períodos prolongados de alcoolização e abstinência podem sintetisar-se da forma seguinte:

- *Na formação do hipocampo*

1. Diminuição da espessura da área denteada e das camadas granular da fáscia denteada e piramidal de CA3, que se mantém com a abstinência.

2. Diminuição da densidade numérica das células granulares, que se agrava com a abstinência.

3. Diminuição da densidade numérica das células piramidais de CA3, que persiste após a abstinência.

4. Aumento da extensão das arborizações dendríticas das células granulares por aumento do comprimento dendrítico total e dos segmentos intermediários e terminais na alcoolização. Contrastando com estes dados verificou-se redução da extensão destas arborizações, por diminuição daqueles três parâmetros, após a abstinência.

5. Ausência de variação na densidade das espinhas dos dendritos daquelas arborizações em todos os grupos experimentais.

6. Manutenção dos padrões topológicos das arborizações dendríticas das células granulares, tanto na alcoolização como na abstinência.

7. Diminuição da densidade volumétrica dos terminais das fibras musgosas aos 6 e 12 meses de alcoolização.

8. Redução da densidade numérica das sinapses entre as fibras musgosas e as células piramidais de CA3 após 18 meses de alcoolização e que se mantém durante a abstinência.

9. Aumento da fracção de membrana dos terminais das fibras musgosas ocupada por zonas activas, que se acentua nos animais sujeitos a abstinência.

- No córtex prelímbico

1. Diminuição da espessura das camadas corticais I-III, que se mantém após a abstinência.

2. Diminuição da densidade numérica das células piramidais da camada III, que se agrava nos animais abstinentes.

3. Ausência de variação dos parâmetros métricos das arborizações dendríticas basais destas células piramidais durante a alcoolização. Na abstinência observou-se diminuição do comprimento dendrítico total, consequência da redução do número de dendritos e de segmentos.

4. Ausência de variações da densidade das espinhas dos dendritos das mesmas arborizações nos animais quer alcoolizados quer abstinentes.

5. Manutenção dos padrões topológicos das arborizações referidas, tanto na alcoolização como na abstinência.

6. Ausência de variações da densidade volumétrica dos terminais nervosos nos grupos alcoolizados e abstinentes.

7. Aumento da densidade volumétrica dos prolongamentos gliais após 12 meses de alcoolização, que se mantém na abstinência.

8. Aumento da densidade numérica, na mesma camada, das sinapses axodendríticas e axospinhosas a partir dos 18 meses de alcoolização, com acentuação na abstinência.

9. Aumento da relação sinapse/neurónio a partir dos 12 meses de alcoolização, que se acentua na abstinência.

Os resultados referidos permitem concluir que:

1. A organização estrutural da formação do hipocampo e do córtex prefrontal do Rato adulto é notoriamente afectada pelo consumo crónico do álcool.

2. As alterações degenerativas evidenciam-se de forma variável e em grau diferente conforme a área estudada e a duração da alcoolização.

3. Tanto na formação do hipocampo como no córtex prefrontal há evidentes potencialidades plásticas que se traduzem pela capacidade de adaptação às modificações impostas pela agressão provocada pelo álcool, embora, obviamente, se não possa inferir das repercussões funcionais desta actividade.

4. As condições criadas pela abstinência alcoólica não interferem com a progressão das alterações da organização estrutural da formação do hipocampo e do córtex prefrontal provocadas pela alcoolização prolongada.

5. Os sinais degenerativos verificados durante a abstinência são até, para algumas estruturas, mais acentuados que na alcoolização pois, além da morte celular ser mais marcada, a actividade plástica dendrítica observada no decurso da alcoolização deixa de se verificar.

6. A plasticidade sináptica, embora mais evidente na abstinência que na alcoolização, poderá não ser de grau suficiente para compensar o agravamento da degenerescência verificada após a supressão do etanol.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Alcoholism is a worldwide medical problem constituting a major health concern as it is implicated in numerous mental and physical disorders.

Alcohol-induced central nervous system dysfunction has severe consequences. However, human neuropathological findings which provided evidence that nervous tissue is highly vulnerable to chronic alcohol intake, were first reported thirty years ago. Besides, it is rather striking that only in the last decade experimental animal models have been developed and sound morphofunctional correlations established. These studies allowed the evaluation of the effects of alcohol upon the structure of the nervous system, and to discriminate these effects from other conditions often linked to chronic alcohol consumption.

The morphological work performed in the Institute of Anatomy of the Oporto Medical School was pioneer in this domain. Using alcohol-fed rats for prolonged periods, attention was first focused on the alcohol-induced effects upon the stucture of the adult rat's cerebellar cortex. As a consequence of these investigations a wide variety of degenerative and plastic reorganizational changes were described.

More recently, these studies were extended to the hippocampal formation and the prefrontal cortex which are known to be involved in cognitive functions deeply affected in chronic alcoholics. The preliminary observations held in these areas were similar to those found in the cerebellum, which encouraged the prosecution of more detailed quantitative investigations. In parallel with the studies of alcohol-induced changes, attention wàs paid to problems related to abstinence following that condition. Thus, withdrawal groups were added to the primitive model.

Groups of 2-month old rats were alcohol-fed for 6, 12 and 18 months with a 20% aqueous ethanol solution and others went through a 6-month withdrawal period after receiving alcohol for 6 and 12 months. Controls were age-matched and pair-fed. Qualitative and quantitative evaluations were performed in the hippocampal formation and prelimbic area of the medial prefrontal cortex. Observations were carried out in epon-embedded and silver impregnated material, as well as, at the ultrastructural level.

The qualitative analysis of Golgi-impregnated material did not reveal detectable alterations of the dendritic organization when alcohol-fed or withdrawal groups were compared with respective controls. Conversely, the observation of semithin sections showed a reduction of the number of dentate granule cells and CA3 pyramidal cells in alcohol-fed and withdrawal animals. The ultrastructural analysis showed signs of dendritic and axonal degeneration along with others of reorganizational activity in the *stratum lucidum* of the hippocampal formation and in the prelimbic layer III neuropil. These plastic changes were more evident in the prelimbic cortex where an increased appearance of perforated synapses and larger extensions of the contacts were observed in alcohol-fed and withdrawal groups.

The quantitative results obtained under those conditions showed:

In the hippocampal formation:

1. Reduction of the thickness of the dentate area and of the dentate granular layer. The thickness of CA3 pyramidal layer in alcohol-fed and withdrawal groups was also reduced.

2. Reduction of the numerical density of granule cells, which worsened after withdrawal.

3. Reduction of the numerical density of CA3 pyramidal cells, which remained unchanged after withdrawal.

4. Increase after alcohol exposure of the total length of granule cell dendritic arborizations, due to the increased length of the intermediate and terminal segments. A reduction of these parameters after withdrawal was detected.

5. Inexistence of changes in the density of the granule cell dendritic spines throughout the experiment in alcohol-fed and withdrawal groups.

6. Inexistence of changes in the topological pattern of the granule cell dendritic trees in alcohol-fed and withdrawal groups.

7. Reduction of the volumetric density of the mossy fiber terminals after 6 and 12 months of alcohol consumption.

8. Reduction of the numerical density of synapses between mossy fiber terminals and CA3 pyramidal cells after 18 months of consuming ethanol, which remained unchanged after withdrawal.

9. Increase of the fraction of the mossy fiber terminal plasmalemma occupied by active zones, which was enhanced after withdrawal.

In the prelimbic cortex:

1. Reduction of the thickness of layers I-III, which remained unchanged after withdrawal.

2. Reduction of the numerical density of layer III pyramidal cells, which worsened after withdrawal.

3. Inexistence of changes in the metric parameters of the pyramidal cell basal dendrites in alcohol-fed animals followed by a decrease of these parameters after withdrawal.

4. Inexistence of changes in the density of basal dendritic spines in alcohol-fed and withdrawal groups.

5. Inexistence of changes in the topological pattern of pyramidal basal dendritic trees in alcohol-fed and withdrawal groups.

6. Inexistence of changes in the volumetric density of layer III terminals in alcohol-fed and withdrawal groups.

7. Increase of the volumetric density of glial processes after 12 months of alcohol feeding, which remained unchanged after withdrawal.

8. Increase of the numerical density of layer III axo-dendritic and axo-spinous synapses following 18 months of alcohol feeding, more evident after withdrawal.

9. Increase of the synapse-to-neuron ratio after 12 months of ethanol exposure, more evident after withdrawal.

The aforementioned results allow to conclude that:

1. The structural organization of the hippocampal formation and of prelimbic cortex is markedly affected after chronic alcohol consumption.

2. The characteristics and the degree of involvement of the areas studied are different. The magnitude of changes were also correlated to the length of the alcohol treatment.

3. Marked plastic potentialities in the hippocampal formation and prefrontal cortex were depicted although it is not possible to infer about their functional implications.

4. Withdrawal following alcohol consumption does not interfere with the structural changes occurring in the hippocampal formation and prefrontal cortex.

5. On the contrary, the degenerative processes observed during withdrawal were more prominent than those seen after alcohol consumption as happened with the increase in cell loss. Besides, plastic dendritic changes were no longer depicted.

6. The synaptic plasticity was more evident after withdrawal. However, it did not appear to be enough to compensate the degeneration observed.

BIBLIOGRAFIA

1. Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat. Rec., 94, 239--247.

2. Abraham, W.C., Hunter, B.E., 1982. An electrophysiological analysis of chronic ethanol neurotoxicity in the dentate gyrus: distribution of entorhinal afferents. Exp. Brain Res., 47, 61-68.

3. Abraham, W.C., Rogers, C.J., Hunter, B.E., 1984. Chronic ethanol-induced decreases in the response of dentate granule cells to perforant path input in the rat. Exp. Brain Res., 54, 406-414.

4. Abraham, W.C., Hunter, B.E., Zornetzer, S.F., Walker, D.W., 1981. Augmentation of short-term plasticity in CA1 of rat hippocampus after chronic ethanol treatment. Brain Res., 221, 271-287.

5. Adams, I., 1987. Plasticity of the synaptic contact zone following loss of synapses in the cerebral cortex of aging humans. Brain Res., 424, 343-351.

6. Adams, I., Jones, D.G., 1981. Synapses and astrocytes in adult rat brain: age-related morphological changes. J. Anat., 133, 476-477.

7. Adams, I., Jones, D.G., 1982. Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early- mid- and late-adulthood. Brain Res., 239, 349-363.

8. Adams, I., Jones, D.G., 1982. Synaptic remodelling and astrocytic hypertrophy in rat cerebral cortex from early to late adulthood. Neurobiol. Aging, 3, 179-186.

9. Adams, R.D., Victor, M., 1981. Alcohol and alcoholism. *In*: Principles of Neurology, 2ª edição, pp. 746--762. Edit. por R.D. Adams e M. Victor, McGraw-Hill, New York.

10. Ahmed, M.G.E., Bedi, K.S., Warren, M.A., Kamel, M.M., 1987. Effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse:granule cell neurons ratio in the rat dentate gyrus. J. Comp. Neurol., 263, 146-158.

11. Amaral, D.G., 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. J. Comp. Neurol., 182, 851-914.

12. Amaral, D.G., Dent, J.A., 1981. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. J. Comp. Neurol., 195, 51-86.

13. Andersen, P., 1975. Organization of hippocampal neurons and their interconnections. *In*: The Hippocampus, Vol. 1, Structure and Development, pp.155-175. Edit. por R.L. Isaacson e K.H. Pribram, Plenum Press, New York, London.

14. Anderson, K.J., Scheff, S.W., DeKosky, S.T., 1986. Reactive synaptogenesis in hippocampal area CA1 of aged and young adult rats. J. Comp. Neurol., 252, 374-384.

15. Andrade, J.P., Cadete-Leite, A., Paula-Barbosa, M.M., Volk, B., Tavares, M. A., 1988. Long-term alcohol consumption reduces the number of neuronal nuclear pores. A morphometric study undertaken in CA3 hippocampal pyramids of rats. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 12, 286-289.

16. Angevine, J.B.,Jr., 1975. Development of the hippocampal region. *In*: The Hippocampus, Vol. 1, Structure and Development, pp.61-94. Edit. por R.L. Isaacson e K.H. Pribram, Plenum Press, New York, London.

17. Bach, G., 1967. Kugelgrossenverteilung und Verteilung der Schnittkreise; ihre wechselseitigen Beziehungen und Verfahren zur Bestimmung der einen aus der andern. *In*: Quantitative Methods in Morphology, pp. 23-45. Edit. por E.R. Weibel e H. Elias, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

18. Balentine, J.D., 1974. Ultrastructural pathology of hyperbaric oxygenation in the central nervous system: observations in anterior horn gray matter. Lab. Invest., 31, 580-592.

19. Barber, R.P., Vaughn, J.E., Wimer, R.E., Wimer, C.C., 1974. Genetically-associated variations in the distribution of dentate granule cells synapses upon the pyramidal cell dendrites in mouse hippocampus. J. Comp. Neurol., 156, 417-434.

20. Barron, K.D., 1975. Ultrastructural changes in dendrites of central neurons during axon reaction. *In*: Advances in Neurology, Vol. 12, Physiology and Pathology of Dendrites, pp. 381-399. Edit. por G.W. Kreutzberg, Raven Press, New York.

21. Bayer, S.A., 1982. Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. Exp. Brain Res., 46, 315-323.

22. Bayer, S.A., Yackel, J.W., Puri, P.S., 1982. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. Science, 216, 890-892.

23. Becker, J.T., Walker, J.A., Olton, D.S., 1980. Neuroanatomical bases of spatial memory. Brain Res., 200, 307-320.

24. Beckstead, R.M., 1979. An autoradiographic examination of cortico-cortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. J. Comp. Neurol., 184, 43-62.

25. Bedi, K.S., Thomas, Y.M., Davies, C.A., Dobbing, J., 1980. Synapse-to-neuron ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life. J. Comp. Neurol., 193, 49-56.

26. Begleiter, H., Porjesz, B., 1977. Persistence of brain hyperexcitability following chronic alcohol exposure in rats. Adv. Exp. Med. Biol., 85 B, 209-222.

27. Begleiter, H., De Noble, V., Porjesz, B., 1980. Protracted brain dysfunction after alcohol withdrawal in monkey. Adv. Exp. Med. Biol., 126, 237-250.

28. Benes, F.M., Paskevich, P.A., Davidson, J., Domesick, V.B., 1985. Synaptic rearrangements in medial prefrontal cortex of haloperidol-treated rats. Brain Res., 348, 15-20.

29. Béraud, C., Fleury, B., 1986. L'alcoolisme est-il une maladie? Gastroenterol. Clin. Biol., 10, 457-460.

30. Berry, M., Pymm, D., 1981. Analysis of neural networks. *In*: Advances in Physiological Science, Vol. 30, Neural Communication and Control, pp.155-169. Edit. por G. Szekely, E. Labos e S. Danjanovich, Akademiai Kiado, Budapest.

31. Berry, M., Hollingworth, T., Anderson, E.M., Flinn, R.M., 1975. Application of the network analysis to the study of the branching patterns of dendritic fields. *In*: Advances in Neurology, Vol. 12, Physiology and Pathology of Dendrites, pp. 217-245. Edit. por G.W. Kreutzberg, Raven Press, New York.

32. Blackstad, T.W., 1956. Comissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. J. Comp. Neurol., 105, 417-537.

33. Blackstad, T.W., 1963. Ultrastructural studies on the hippocampal region. Progr. Brain Res., 3, 122-148.

34. Blackstad, T.W., Kjaerheim, A., 1961. Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. J. Comp. Neurol., 117, 133-159.

35. Blue, M.E., Parnavelas, J.G., 1983. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. J. Neurocytol., 12, 697-712.

36. Borges, M.M., Paula-Barbosa, M.M., Volk, B., 1986. Chronic alcohol consumption induces lipofuscin deposition in the rat hippocampus. Neurobiol. Aging, 7, 347-355.

37. Borges, M.M., Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1984. Deposição de lipofuscina nas células piramidais (CA1-CA3) do hipocampo do rato adulto submetido a alcoolização e hiponutrição crónicas. Ciênc. Biol. (Portugal), 9, 19-20.

38. Boss, B.D., Peterson, G.M., Cowan, W.M., 1985. On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. Brain Res., 338, 144-150.

39. Boss, B.D., Turlejski, K., Stanfield, B.B., Cowan, W.M., 1987. On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. Brain Res., 406, 280-287.

40. Braak, H., Braak, E., 1985. Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. Progr. Neurobiol., 25, 93-139.

41. Braendgaard, H., Gundersen, H.J.G., 1986. The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. J. Neurosci. Meth., 18, 39-78.

42. Brizzee, K.R., 1973. Quantitative histological studies on aging changes in cerebral cortex of rhesus monkey and albino rat with notes on effects of prolonged low-dose ionizing irradiation in the rat. Progr. Brain Res., 40, 141-160.

43. Brizzee, K.R., Ordy, J.M., Bartus, R.T., 1980. Localization of cellular changes within multimodal sensory regions in aged monkey brain: possible implications for age-related cognitive loss. Neurobiol. Aging, 1, 45-52.

44. Brody, H., 1955. Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. J. Comp. Neurol., 102, 511-556.

45. Brutkowski, S., 1965. Functions of the prefrontal cortex in animals. Physiol. Rev., 45, 721-746.

46. Buell, S.J., Coleman, P.D., 1979. Dendritic growth in the aged human brain and failure of growth in senile dementia. Science, 206, 854-856.

47. Buell, S.J., Coleman, P.D., 1981. Quantitative evidence for selective dendritic growth in normal aging but not in senile dementia. Brain Res., 214, 23-41.

48. Caceres, A., Steward, O., 1983. Dendritic reorganization in the denervated dentate gyrus of the rat following entorhinal cortical lesions: a Golgi and electron microscopic analysis. J. Comp. Neurol., 214, 387-403.

49. Cadete-Leite, A., Alves, M.C., Tavares, M.A., 1988. Lysosomal abnormalities in the pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex after chronic alcohol consumption and withdrawal. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 20, 115-122.

50. Calverley, R.K.S., Jones, D.G., 1987. A serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. Cell Tissue Res., 247, 565-572.

51. Calverley, R.K.S., Jones, D.G., 1987. Determination of the numerical density of perforated synapses in rat neocortex. Cell Tissue Res.,248, 399-407.

52. Carlen, P.L., Wilkinson, A., 1981. Alcoholic brain damage and reversible deficits. Acta Psychiatr. Scand., Suppl. 62, 103-118.

53. Carlen, P.L., Wilkinson, A., Wortzman, G., Holgate, R., Cordingley, J., Lee, M.A., Huszar, L., Moddel, G., Singh, R., Kiraly, L., Rankin, J.G., 1981. Cerebral atrophy and functional deficits in alcoholics without clinically apparent liver disease. Neurology, 31, 377-385.

54. Carlen, P.L., Wortzman, R.C., Wilkinson, D.A., Rankin, J.G., 1978. Reversible cerebral atrophy in recently abstinent chronic alcoholics measured by computed tomography scans. Science, 200, 1076-1078.

55. Carlin, R.K., Siekevitz, P., 1983. Plasticity in the central nervous system: do synapses divide? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3517-3521.

56. Cicero, T.J., 1980. Animal models of alcoholism? *In*: Animal Models in Alcohol Research, pp. 99-117. Edit. por K. Eriksson, J.D. Sinclair e K. Kiianmaa, Academic Press, London.

57. Claiborne, B.J., Amaral, D.G., Cowan, W.M., 1986. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. J. Comp. Neurol., 246, 435-458.

58. Cohen, R.S., Siekevitz, P., 1978. Form of the postsynaptic density. A serial section study. J. Cell Biol., 78, 36-46.

59. Coimbra, A., Ribeiro-da-Silva, A., Pignatelli, D., 1984. Effects of dorsal rhizotomy on the several types of primary afferent terminals in laminae I-III of the rat spinal cord. An electron microscope study. Anat. Embryol., 170, 279-287.

60. Coleman, P.D., Flood, D.G., 1986. Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism. *In*: Progress in Brain Research, Vol. 70, Aging of the Brain and Alzheimer's Disease, pp. 227-237. Edit. por D.F. Swaab, E. Fliers, M. Mirmiram, W.A. Van Gool e F. Van Haaren, Elsevier, Amsterdam.

61. Coleman, P.D., Flood, D.G., 1987. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging, 8, 521-545.

62. Coleman, P.D., Flood, D.G., West, M.J., 1987. Volumes of the components of the hippocampus in aging F344 rat. J. Comp. Neurol., 266, 300-306.

63. Collier, T.J., Quirk, G.J., Routtenberg, A., 1987. Separable roles of hippocampal granule cells in forgetting and pyramidal cells in remembering spatial information. Brain Res., 409, 316-328.

64. Collier, T.J., Miller, J.S., Travis, J., Routtenberg, A., 1982. Dentate gyrus granule cells and memory: electrical stimulation disrupts memory for places rewarded. Behav. Neural Biol., 34, 227-339.

65. Colonnier, M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscopic study. Brain Res., 9, 268-287.

66. Connor, J.R., Diamond, M.C., Johnson, R.E., 1980. Occipital cortical morphology of the rat: alterations with age and environment. Exp. Neurol., 68, 158-170.

67. Connor, J.R., Diamond, M.C., Connor, J.A., Johnson, R.E., 1981. A Golgi study of dendritic morphology in the occipital cortex of socially reared aged rats. Exp. Neurol,, 73, 525-533.

68. Connor, J.R., Beban, S.E., Hopper, P.A., Hansen, B., Diamond, M.C., 1982. A Golgi study of the superficial pyramidal cells in the somatosensory cortex of socially reared old adult rats. Exp. Neurol., 76, 35-45.

69. Conover, W.J., 1980. Practical Nonparametric Statistics, 2ª edição. Wiley, New York.

70. Cotman, C.W., Scheff, S.W., 1979. Compensatory synapse growth in aged animals after neuronal death. Mech. Ageing Dev., 9, 103-117.

71. Courville, C.B., 1955. Effects of Alcohol on the Nervous System of Man. San Lucas Press, Los Angeles.

72. Cragg, B.G., 1967. The density of synapses and neurons in the motor and visual areas of the cerebral cortex. J. Anat., 101, 639-654.

73. Cragg, B.G., 1970. Synapses and membranous bodies in experimental hypothyroidism. Brain Res., 18, 297-307.

74. Crespo, D., Stanfield, B.B., Cowan, W.M., 1986. Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. Exp. Brain Res., 62, 541-548.

75. Cruz-Orive, L.M., 1978. Particle size-shape distribution: the general spheroid problem. II. Stochastic model and practical guide. J. Microsc., 112, 153-167.

76. Cruz-Orive, L.M., 1980. On the estimation of particle number. J. Microsc., 120, 15-27.

77. Cruz-Orive, L.M., Hunziker, E.B., 1986. Stereology for anisotropic cells: application to growth cartilage. J. Microsc., 143, 47-80.

78. Cupp, C.J., Uemura, E., 1980. Age-related changes in prefrontal cortex of Macaca mulatta: quantitative analysis of dendritic branching patterns. Exp. Neurol., 69, 143-163.

79. Curcio, C.A., Coleman, P.D., 1982. Stability of neuron number in cortical barrels of aging mice. J. Comp. Neurol., 212, 158-172.

80. Curcio, C.A., McNelly, N.A., Hinds, J.W., 1985. Aging in the rat olfactory system: relative stability of piriform cortex contrasts with changes in olfactory bulb and olfactory epithelium. J. Comp. Neurol., 235, 519-528.

81. De Groot, D.M.G., Bierman, E.P.B., 1983. The complex-shaped 'perforated' synapse, a problem in quantitative stereology of the brain. J. Microsc., 131, 355-360.

82. De Groot, D.M.G., Bierman, E.P.B., 1986. A critical evaluation of methods for estimating the numerical density of synapses. J. Neurosci. Meth., 18, 79-101.

83. De Ruiter, J.P., Uylings, H.B.M., 1987. Morphometric and dendritic analysis of fascia dentata granule cells in human aging and senile dementia. Brain Res., 402, 217-229.

84. Desmond, N.L., Levy, W.B., 1982. A quantitative anatomical study of the granule cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. J. Comp. Neurol., 212, 131-145.

85. Desmond, N.L., Levy, W.B., 1985. Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. Neurosci. Lett., 54, 219-224.

86. Desmond, N.L., Levy, W.B., 1986. Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. J. Comp. Neurol., 253, 466-475.

87. Diamond, M.C., Johnson, R.E., Young, D., Singh, S.S., 1983. Age-related morphologic differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: male-female; right-left. Exp. Neurol., 81, 1-13.

88. Diamond, M.C., Murphy, G., Akiyama, K., Johnson, R.E., 1982. Morphological hippocampal asymmetry in male and female rats. Exp. Neurol., 76, 553-566.

89. Diamond, M.C., Johnson, R.E., Protti, A.M., Ott, C., Kajisa, L., 1985. Plasticity in the 904-day-old male rat cerebral cortex. Exp. Neurol., 87, 309-317.

90. Divac, I., Kosmal, A., Björklund, A., Lindvall, O., 1978. Subcortical projections to the prefrontal cortex in the rat as revealed by the horseradish-peroxidase technique. Neuroscience, 3, 785-796.

91. Dole, V.P., 1986. On the relevance of animal models to alcoholism in humans. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 10, 361-363.

92. Dowling, G.A., Diamond, M.C., Murphy, G.M., Johnson, R.E., 1982. A morphological study of male rat cerebral cortical asymmetry. Exp. Neurol., 75, 51-67.

93. Dyson, S.E., Jones, D.G., 1984. Synaptic remodelling during development and maturation; junction differentiation and splitting as a mechanism for modifying connectivity. Dev. Brain Res., 13, 125-137.

94. Eayrs, J.T., 1955. The cerebral cortex of normal and hypothyroid rats. Acta Anat., 25, 160-183.

95. Eckardt, M.J., Campbell, G.A., Marietta, C.A., Majchrowicz, E., Wixon, H. N., Weight, F.F., 1986. Cerebral 2-deoxyglucose uptake in rats during ethanol withdrawal and postwithdrawal. Brain Res., 366, 1-9.

96. Eckenhoff, M.F., Rakic, P., 1984. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. J. Comp. Neurol., 223, 1-21.

97. Eriksson, C.J.P., Sippel, H.W., 1977. The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation. I. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. Biochem. Pharmacol., 26, 241--247.

98. Fairén, A., De Felipe, J., Regidor, J., 1984. Nonpyramidal neurons. General account. *In*: Cerebral Cortex, Vol. 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex, pp. 201-253. Edit. por A. Peters e E.G. Jones, Plenum Press, New York, London.

99. Feldman, M.L., 1977. Dendritic changes in aging rat brain: pyramidal cell dendrite length and ultrastructure. *In*: The Aging Brain and Senile Dementia, pp. 23-37. Edit. por K. Nandy e I. Sherwin, Plenum Press, New York.

100. Feldman, M.L., 1984. Morphology of the neocortical pyramidal neuron. *In*: Cerebral Cortex, Vol. 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex, pp. 123-200. Edit. por A. Peters e E.G. Jones, Plenum Press, New York, London.

101. Feldman, M.L., Peters, A., 1978. The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat. J. Comp. Neurol., 179, 761-794.

102. Feldman, M.L., Peters, A., 1979. A technique for estimating total spine numbers on Golgi-impregnated dendrites. J. Comp. Neurol., 188, 527-542.

103. Ferino, F., Thierry, A. M., Glowinski, J., 1987. Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. Exp. Brain Res., 65, 421-426.

104. Ferrer, I., Fabregues, I., Pineda, M., Garcia, I., Ribalta,T., 1984. A Golgi study of cerebellar atrophy in human chronic alcoholism. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 10, 245-253.

105. Ferrer, I., Fábregues, I., Rairiz, J., Galofré, E., 1986. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. Neurosci. Lett., 69, 115-119.

106. Flood, D.G., Guarnaccia, M., Coleman, P.D., 1987. Dendritic extent in human CA2-3 hippocampal pyramidal neurons in normal aging and senile dementia. Brain Res., 409, 88-96.

107. Flood, D.G., Buell, S.J., Horwitz, G.J., Coleman, P.D., 1987. Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. Brain Res., 402, 205-216.

108. Flood, D.G., Buell , S.J., Defiore, C.H., Horwitz, G.J., Coleman, P.D., 1985. Age-related dendritic growth in dentate gyrus of human brain is followed by regression in the 'oldest old'. Brain Res., 345, 366-368.

109. Fonseca, A.F., 1985. Psiquiatria e Psicopatologia, Vol.1. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

110. Freund, G., 1969. Alcohol withdrawal syndrome in mice. Arch. Neurol., 21, 315-320.

111. Freund, G., 1973. Chronic central nervous system toxicity of alcohol. Ann. Rev. Pharmacol., 13, 217-227.

112. Frotscher, M., Zimmer, J., 1983. Lesion-induced mossy fibers to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. J. Comp. Neurol., 215, 299--311.

113. Frotscher, M., Hámori, J., Wenzul, J., 1977. Transneuronal effects of entorhinal lesions in the early postnatal period on synaptogenesis in the hippocampus of the rat. Exp. Brain Res., 30, 549-560.

114. Gaarskjaer, F.B., 1978. Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. J. Comp. Neurol., 178, 49-72.

115. Gaarskjaer, F.B., 1986. The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. Brain Res. Rev., 11, 335-357.

116. Geinisman, Y., De Toledo-Morrell, L., Morrell, F., 1986. Aged rats need a preserved complement of perforated axospinous synapses per hippocampal neuron to maintain good spatial memory. Brain Res., 398, 266-275.

117. Geinisman, Y., Morrell, F., De Toledo-Morrell, L., 1987. Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections. Brain Res., 423, 179-188.

118. Gibson, W.E., 1985. Effects of alcohol on radial maze performance in rats. Physiol. Behav., 35, 1003--1005.

119. Goldman-Rakic, P.S., Porrino, L.J., 1985. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. J. Comp. Neurol., 242, 535-560.

120. Goldsmith, P.L., 1967. The calculation of true particle size distribution from the sizes observed in a thin slice. Brit. J. Appl. Physiol., 18, 813-830.

121. Goldstein, B., Maxwell, D.S., Ellison, G., Hammer, R.P., 1983. Dendritic vacuolization in the central nervous system of rats after long-term voluntary consumption of ethanol. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 42, 579-589.

122. Grant, G., 1975. Retrograde dendritic degeneration. *In*: Advances in Neurology, Vol. 12, Physiology and Pathology of Dendrites, pp. 373-379. Edit. por G.W. Kreutzberg, Raven Press, New York.

123. Gray, E.G., 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. J. Anat., 93, 420-433.

124. Gray, E.G., 1963. A note on the dendritic spine apparatus. J. Anat., 97, 389-392.

125. Green, E.J., Juraska, J.M., 1985. The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: a quantitative Golgi study. Exp. Brain Res., 59, 582-586.

126. Greenough, W.T., West, R.W., De Voogd, T.J., 1978. Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat. Science, 202, 1096-1098.

127. Guillery, R.W., 1970. Light- and electron-microscopical studies of normal and degenerating axons. *In*: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, pp. 77-105. Edit. por W.J.H. Nauta e S.O.E. Ebbesson, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

128. Gundersen, H.J.G., 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J. Microsc., 111, 219-223.

129. Gundersen, H.J.G., 1986. Stereology of arbitrary particles. J. Microsc., 143, 3-45.

130. Hamlyn, L.H., 1962. The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. J. Anat. Physiol., 96, 112-126.

131. Handelmann, G.E., Olton, D.S., 1981. Spatial memory following damage to hippocampal CA3 pyramidal cells with kainic acid: impairment and recovery with preoperative training. Brain Res., 217, 41-58.

132. Harper, C., Kril, J., Daly, J., 1987. Are we drinking our neurons away? Brit. Med. J., 294, 534-536.

133. Herkenham, M., 1980. Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. Science, 207, 532-534.

134. Hill, S.Y., 1985. The disease concept of alcoholism: a review. Drug Alc. Depend., 16, 193-214.

135. Hillman, D.E., Chen, S., 1984. Reciprocal relationship between size of postsynaptic densities and their number: constancy in contact area. Brain Res., 295, 325-343.

136. Hjorth-Simonsen, A., 1971. Hippocampal efferents to the ipsilateral entorhinal area: an experimental study in the rat. J. Comp. Neurol., 142, 417-437.

137. Hjorth-Simonsen, A., 1973. Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. J. Comp. Neurol., 147, 145-162.

138. Hoff, S.F., 1986. Lesion-induced transneuronal plasticity in the adult rat hippocampus. Neuroscience, 19, 1227-1233.

139. Hoff, S.F., Scheff, S.W., Kwan, A.Y., Cotman, C.W., 1981. A new type of lesion-induced synaptogenesis. I. Synaptic turnover in non-denervated zones of the dentate gyrus in young adult rats. Brain Res., 222, 1--13.

140. Hollingworth, T., Berry, M., 1975. Network analysis of dendritic fields of pyramidal cells in neocortex and Purkinje cells in the cerebellum of the rat. Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B, 270, 227-264.

141. Hubbard, B.M., Anderson, J.M., 1981. A quantitative study of cerebral atrophy in old age and senile dementia. J. Neurol. Sci., 50, 135-145.

142. Hunter, B.E., Walker, D.W., 1978. Ethanol dependence in the rat: role of extrapyramidal motor systems in the withdrawal reaction. Exp. Neurol., 62, 374-393.

143. Hyman, B.T., Van Hoesen, G.W., Damasio, A.R., Barnes, C.L., 1984. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. Science, 225, 1168-1170.

144. Isaacson, R.L., 1982. The Limbic System, 2ª edição. Plenum Press, New York.

145. Jarlstedt, J, 1972. Experimental alcoholism in rats: protein synthesis in subcellular fractions from cerebellum, cerebral cortex, and liver after long-term treatment. J. Neurochem., 19, 603-608.

146. Jarrard, L.E., 1986. Selective hippocampal lesions and behavior. Implications for current research and theorizing. *In*: The Hippocampus, Vol. 4, pp. 93-126. Edit. por R.L. Isaacson e K.H. Pribram, Plenum Press, New York, London.

147. Jones, D.G., 1988. Synaptic trends and synaptic remodelling in the developing and mature neocortex. *In*: Neural Plasticity: A Lifespan Approach, pp. 21-42. Alan R. Liss, Inc., New York.

148. Jones, D.G., Colangelo, W., 1985. Ultrastructural investigation into the influence of ethanol on synaptic maturation in rat neocortex. I. Qualitative assessment. Dev. Neurosci., 7, 94-106.

149. Jones, D.G., Colangelo, W., 1985. Ultrastructural investigation into the influence of ethanol on synaptic maturation in rat neocortex. II. Quantitative analysis. Dev. Neurosci., 7, 107-119.

150. Jones, D.G., Smith, B.J., 1980. The hippocampus and its response to differential environments. Progr. Neurobiol., 15, 19-69.

151. Juraska, J.M., Fitch, J.M., Henderson, C., Rivers, N., 1985. Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience. Brain Res., 333, 73-80.

152. Kalant, H., Woo, N., 1981. Electrophysiological effects of ethanol on the nervous system. Pharmac. Ther., 14, 431-457.

153. Karwacka, H., 1980. Ultrastructural and biochemical studies of the brain and other organs in rats after chronic ethanol administration. II. Electron microscopic studies of rat brain after chronic ethanol administration. Exp. Pathol., 18, 127-135.

154. Kolb, B., 1984. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. Brain Res. Rev., 8, 65-98.

155. Kolb, B., Sutherland, R.J., Whishaw, I.Q., 1983. A comparison of the contributions of the frontal and parietal association cortex to spatial localization in rats. Behav. Neurosci., 97, 13-27.

156. Konigsmark, B.W., 1970. Methods for counting neurons. *In*: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, pp. 315-340. Edit. por W.J.H. Nauta e S. O.E. Ebbesson, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

157. Krettek, J.E., Price, J.L., 1977. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J. Comp. Neurol., 171, 157-192.

158. Krieg, W.J.S., 1946. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A. Topography of the cortical areas. J. Comp. Neurol., 84, 221-275.

159. Krieg, W.J.S., 1946. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. B. Structure of the cortical areas. J. Comp. Neurol., 84, 277-323.

160. Kunz, G., Englisch, J.H., Wenzel, J., 1976. Untersuchungen zuer Spines-Verteilung an Pyramidenneu-

ronen der CA1-Region des Hippocampus der Ratte nach langzeitiger oraler Alkohol Applikation. J. Hirnforsch., 17, 351-363.

161. Laatsch, R.H., Cowan, W.M., 1966. Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. J. Comp. Neurol., 128, 359-396.

162. Landfield, P.W., Waymire, J.C., Lynch, G., 1978. Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. Science, 202, 1098-1102.

163. Landfield, P.W., Braun, L.D., Pitler, T.A., Lindsey, J.D., Lynch, G., 1981. Hippocampal aging in rats: a morphometric study of multiple variables in semithin sections. Neurobiol. Aging, 2, 265-275.

164. Lee, K.S., Stanford, E.J., Cotman, C.W., Lynch, G.S., 1977. Ultrastructural evidence for bouton proliferation in the partially deafferented dentate gyrus of the adult rat. Exp. Brain Res., 29, 475-485.

165. Lee, K., Dunwiddie, T., Deitrich, R., Lynch, G., Hoffer, B., 1981. Chronic ethanol consumption and hippocampal neuron dendritic spines: a morphometric and physiological analysis. Exp. Neurol., 71, 541-549.

166. Leo, M.A., Lieber, C.S., 1982. Hepatic vitamin A depletion in alcoholic liver injury. New Engl. J. Med., 307, 597-601.

167. Leonard, C.M., 1969. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. Brain Res., 12, 321-343.

168. Lescaudron, L., Verna, A., 1985. Effects of chronic ethanol consumption on pyramidal neurons of the mouse dorsal and ventral hippocampus: a quantitative histological analysis. Exp. Brain Res., 58, 362-367.

169. Lescaudron, L., Beracochea, D., Verna, A., Jaffard, R., 1984. Chronic ethanol consumption induces neuronal loss in mammillary bodies of the mouse: a quantitative analysis. Neurosci. Lett., 50, 151-155.

170. Leuba, G., 1983. Aging of dendrites in the cerebral cortex of the mouse. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 9, 467-475.

171. Lieber, C.S., DeCarli, L.M., 1982. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 6, 523-531.

172. Lieber, C.S., DeCarli, L.M., 1986. The feeding of ethanol in liquid diets. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 10, 550-553.

173. Lieber, C.S., Jones, D.P., Mendelson, J., DeCarli, L.M., 1963. Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption, despite adequate dietary intake. Trans. Assoc. Am. Physicians, 76, 289-300.

174. Lima, D., Coimbra, A., 1983. The neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. A study based on reconstructions of serially sectioned cells. Anat. Embryol., 167, 273-288.

175. Lindsay, R.D., Scheibel, A.B., 1976. Quantitative analysis of dendritic branching pattern of granular cells from human dentate gyrus. Exp. Neurol., 52, 295-310.

176. Lindsay, R.D., Scheibel, A.B., 1981. Quantitative analysis of the dendritic branching pattern of granule cells from adult rat dentate gyrus. Exp. Neurol., 73, 286-297.

177. Lishman, W.A., 1981. Cerebral disorder in alcoholism: syndromes of impairment. Brain, 104, 1-20.

178. Lorente de Nó, R., 1934. Studies on the structure of cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. J. Psychol. Neurol. (Leipzig), 46, 113-117.

179. Lynch, G., Cotman, C.W., 1975. The hippocampus as a model for studying anatomical plasticity in the adult brain. *In*: The Hippocampus, Vol. 1, Structure and Development, pp. 123-154. Edit. por R.L. Isaacson e K.H. Pribram, Plenum Press, New York, London.

180. Lynch, M.J.G., 1960. Brain lesions in chronic alcoholism. A.M.A. Arch. Pathol., 69, 342-353.

181. Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., 1988. Unbiased estimate of cerebellar cell numbers in hypothyroid and in sex- age-matched control rats. J. Hirnforsch., 29, em publicação.

182. Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., 1988. Unbiased estimate of hippocampal granule cell numbers in hypothyroid and in sex- age-matched control rats. J. Hirnforsch., 29, em publicação.

183. Majchrowicz, E., 1981. Reversal in central nervous system function during ethanol withdrawal in humans and experimental animals. Fed. Proc., 40, 2065-2072.

184. Majchrowicz, E., Hunt, W.A., 1980. Similarities in some neurological, physiological and neurochemical aspects of the ethanol withdrawal syndrome in humans and experimental animals. *In*: Animal Models in Alcohol Research, pp. 419-424. Edit. por K. Eriksson, J.D. Sinclair e K. Kiianmaa, Academic Press, London.

185. Markowitsch, H.J., 1982. Thalamic mediodorsal nucleus and memory: a critical evaluation of studies in animals and man. Neurosci. Biobehav. Rev., 6, 351-380.

186. McMullen, P.A., Saint-Cyr, J.A., Carlen, P.L., 1984. Morphological alterations in rat CA1 hippocampal pyramidal cell dendrites resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal. J. Comp. Neurol., 225, 111-118.

187. McWilliams, J.R., Lynch, G., 1984. Synaptic density and axonal sprouting in rat hippocampus: stability in adulthood and decline in late adulthood. Brain Res., 294, 152-156.

188. Meish, R.A., 1982. Animal studies of alcohol intake. Brit. J. Psychiat., 141, 113-120.

189. Mendelson, J.H., Mello, N.K., 1979. The diagnosis of alcoholism. *In*: The Diagnosis and Treatment of Alcoholism, pp. 2-18. Edit. por J.H. Mendelson e N.K. Mello, McGraw-Hill, New York.

190. Mesulam, R.M., 1986. Frontal cortex and behavior. Ann. Neurol., 19, 320-325.

191. Mezey, E., Potter, J.J., Slusser, R.J., Brandes, D., Romero, J., Tamura, T., Halsted, C.H., 1980. Effect of ethanol feeding on hepatic lysosomes in the monkey. Lab. Invest., 43, 88-93.

192. Millhouse, O.E., 1981. The Golgi methods. *In*: Neuroanatomical Tract-Tracing Methods, pp. 311-344. Edit. por L. Heimer e M.J. RoBards, Plenum Press, New York, London.

193. Milner, B., Petrides, M., 1984. Behavioural effects of frontal-lobe lesions in man. Trends Neurosci., 7, 403-407.

194. Milner, B., Petrides, M., Smith, M.L., 1985. Frontal lobes and the temporal organization of memory. Human Neurobiol., 4, 137-142.

195. Mishkin, M., 1982. A memory system in the monkey. Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B, 298, 85-92.

196. Morgan, M.Y., 1982. Alcohol and nutrition. Brit. Med. Bull., 38, 21-29.

197. Müller, L.J., 1983. Postnatal development of synaptic contacts in the visual cortex of rabbits. Tese de Doutoramento. Universidade de Amsterdam.

198. Müller, L.J., Verwer, R.W.H., Nunez-Cardoso, B., Vrensen, G., 1984. Synaptic characteristics of identified pyramidal and multipolar non-pyramidal neurons in the visual cortex of young and adult rabbits. A quantitative Golgi-electron microscope study. Neuroscience, 12, 1071-1084.

199. Nachman, M., Lester, D., LeMagnen, J., 1970. Alcohol aversion in the rat: behavioral assessment of noxious drug effects. Science, 168, 1244-1246.

200. Nakamura, S., Akiguchi, I., Kameyama, M., Mizuno, N., 1985. Age-related changes of pyramidal cell basal dendrites in layers III and V of human motor cortex: a quantitative Golgi study. Acta Neuropathol., 65, 281--284.

201. Newlin, S.A., Mancillas-Trevino, J., Bloom, F.E., 1981. Ethanol causes increases in excitation and inhibition in area CA3 of the dorsal hippocampus. Brain Res., 209, 113-128.

202. Nieto-Sampedro, M., Hoff, S.F., Cotman, C.W., 1982. Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5718-5722.

203. Nieto-Sampedro, M., Saneto, R.P., de Vellis, J., Cotman, C.W., 1985. The control of glial populations in brain: changes in astrocyte mitogenic and morphogenic factors in response to injury. Brain Res., 343, 320--328.

204. Nobrega, J.N., Toepell, A.P., Rakoff, V., 1987. Changes in local cerebral glucose utilization after chronic ethanol in rats. Exp. Neurol., 95, 303-312.

205. Nonneman, A.J., Voigt, J., Kolb, B.E., 1974. Comparisons of behavioral effects of hippocampal and prefrontal cortex lesions in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 87, 249-260.

206. O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. Hippocampus as a cognitive map. Oxford University Press, London.

207. O'Kusky, J., Colonnier, M., 1982. A laminar analysis of the number of neurons, glia and synapses in the visual cortex (area 17) of adult macaque monkeys. J. Comp. Neurol., 210, 278-290.

208. Olton, D.S., Walker, J.A., Gage, F.H., 1978. Hippocampal connections and spatial discrimination. Brain Res., 139, 295-308.

209. Ordy, J.M., Brizzee, K.R., Kaack, B., Hansche, J., 1978. Age differences in short-term memory and cell loss in the cortex of the rat. Gerontology, 24, 276-285.

210. Overdijk, J., Uylings, H.B.M., Kuypers, K., Kamstra, A.W., 1978. An economical, semi-automatic system for measuring cellular tree structures in three dimensions, with special emphasis on Golgi-impregnated neurons. J. Microsc., 114, 271-284.

211. Palay, S.L., Chan-Palay, V., 1974. Cerebellar Cortex: Cytology and Organization. Springer-Verlag, Berlin.

212. Parnavelas, J.G., Lynch, G., Brecha, N., Cotman, C.W., Globus, A., 1974.Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. Nature, 248, 71-73.

213. Parsons, O.A., 1977. Neuropsychological deficits in alcoholics: facts and fancies. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 1, 51-56.

214. Paula-Barbosa, M.M., 1977. Terminais Musgosos do Cerebelo (Estudo Ultrastrutural). Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.

215. Paula-Barbosa, M.M., Sobrinho-Simões, M.A., 1976. An ultrastructural morphometric study of mossy fiber endings in pigeon, rat and man. J. Comp. Neurol., 170, 365-380.

216. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., 1984. Neuritic plaque-like structures in the rat cerebellum following prolonged alcohol consumption. Experientia, 40, 110-112.

217. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., 1985. Envelhecimento neuronal precoce no alcoolismo crónico (Estudo morfológico experimental). J. Soc. Ciências Médicas Lisboa, 1-20.

218. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., 1985. Long term alcohol consumption induces microtubular changes in the adult rat cerebellar cortex. Brain Res., 339, 195-199.

219. Paula-Barbosa, M.M., Sobrinho-Simões, M.A., Ruela, C., 1980. Comparative morphometric study of cerebellar neurons. I. Granule cells. Acta Anat., 106, 262-269.

220. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Saraiva, A.A., 1980. Dendritic abnormalities in patients with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). Acta Neuropathol., 52, 77-80.

221. Paula-Barbosa, M.M., Borges, M.M., Cadete-Leite, A., Tavares, M.A., 1986. Giant multivesicular bodies in the rat hippocampal pyramidal cells after chronic alcohol consumption. Neurosci. Lett., 64, 345-349.

222. Paula-Barbosa, M.M., Cardoso, R.M., Guimarães, M.L., Cruz, C., 1980. Dendritic degeneration and regrowth in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. J. Neurol. Sci., 45, 129-134.

223. Paula-Barbosa, M.M., Ruela, C., Faria, R., Cruz, C., 1980. Cerebral cortex dendritic degeneration in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). Neurology, 30, 7-11.

224. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Borges, M.M., Gray, E.G., 1984. Presynaptic inclusions in mossy fibre terminals of the cerebellar cortex following long-term undernutrition in adult rats. J. Neurocytol., 13, 841-847.

225. Paula-Barbosa, M.M., Tavares, M.A., Ruela, C., Barroca, H., 1983. The distribution of stellate cell descending axons in the rat cerebellum: a Golgi and combined Golgi-electron microscopical study. J. Anat.,137, 757-764.

226. Paula-Barbosa, M.M., Andrade, J.P., Azevedo, F.P., Madeira, M.D., Alves, M.C., 1988. Lengthy administration of low-protein diet to adult rats induces cell loss in the hippocampal formation but not in the medial prefrontal cortex. Soc. Neurosci. Abstr., 14, 368.

227. Pentney, R.J., 1982. Quantitative analysis of ethanol effects on Purkinje cell dendritic tree. Brain Res. 249, 397-401.

228. Peters, A., Feldman, M.L., 1976. Projection of lateral geniculate nucleus to area 17 of rat cerebral cortex. I. General description. J. Neurocytol., 5, 63-84.

229. Peters, A., Jones, E.G., 1984. Classification of cortical neurons. *In*: Cerebral Cortex, Vol. 1, Cellular Components of the Cerebral Cortex, pp. 107-121. Edit. por A. Peters e E.G. Jones, Plenum Press, New York, London.

230. Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R., 1969. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. Z. Zellforsch, 100, 487-506.

231. Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R., 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. Am. J. Anat., 127, 321-356.

232. Peters, A., Kara, D.A., 1985. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells. J. Comp. Neurol., 234, 218-241.

233. Peters, A., Kara, D.A., 1985. The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. II. The nonpyramidal cells. J. Comp. Neurol., 234, 242-263.

234. Peters, A., Feldman, M.L., Vaughan, D.W., 1983. The effect of aging on the neuronal population within area 17 of adult rat cerebral cortex. Neurobiol. Aging, 4, 273-282.

235. Peters, A., Palay, S.L., Webster, H.F., 1976. The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

236. Petito, C.K., Pulsinelli, W.A., 1984. Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. J. Cereb. Blood Flow Metab., 4, 194-205.

237. Phillips, S.C., 1985. Age-dependent susceptibility of rat cerebellar Purkinje cells to ethanol exposure. Drug Alc. Depend., 16, 273-277.

238. Phillips, S.C., 1985. Qualitative and quantitative changes of mouse cerebellar synapses after chronic alcohol consumption and withdrawal. Exp. Neurol., 88, 748-756.

239. Phillips, S.C., Cragg, B.G., 1982. A change in susceptibility of rat cerebellar Purkinje cells to damage by alcohol during fetal, neonatal and adult life. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 8, 441-454.

240. Phillips, S.C., Cragg, B.G., 1983. Chronic consumption of alcohol by adult mice: effect on hippocampal cells and synapses. Exp. Neurol., 80, 218-226.

241. Phillips, S.C., Cragg, B.G., 1984. Alcohol withdrawal causes a loss of cerebellar Purkinje cells in mice. J. Stud. Alcohol, 45, 475-480.

242. Popova, E.N., 1978. Changes in dendrites of cortical neurons in experimental alcohol intoxication. Biull. Eksp. Biol. Med., 85, 87-89.

243. Poser, M., 1978. Dysmyelination revisited. Arch. Neurol., 35, 401-402.

244. Ramón y Cajal, S., 1909. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Vol. II. Trad. por L. Azoulay, Maloine, Paris.

245. Redmond, P.G., Cohen, G., 1972. Sex-differences in acetaldehyde exhalation following ethanol administration in C57 BL mice. Nature, 236, 117-119.

246. Reep, R., 1984. Relationship between prefrontal and limbic cortex: a comparative anatomical review. Brain Behav. Evol., 25, 5-80.

247. Ribeiro-da-Silva, A.R., 1984. Glomérulos Sinápticos da Substância Gelatinosa da Medula Espinal. Estudo Ultrastrutural. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.

248. Richter, C.P., 1926. A study of the effect of moderate doses of alcohol on the growth and behavior of the rat. J. Exp. Zool., 44, 397-418.

249. Riley, J.N., 1977. Alterations in dendritic morphology following chronic alcohol consumption: a Golgi analysis. Tese de Doutoramento. Universidade de Florida.

250. Riley, J.N., Walker, D.W., 1978. Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. Science, 201, 646-648.

251. Rogers, J., Zornetzer, S.F., Bloom, F.E., Mervis, R.E., 1984. Senescent microstructural changes in rat cerebellum. Brain Res., 292, 23-32.

252. Room, P., Russchen, F.T., Groenewegen, H.J., Lohman, A.H.M., 1985. Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. J. Comp. Neurol., 242, 40-55.

253. Rose, M., 1929. Cytoarchitektonischer Atlas der Grosshirnrinde der Maus. J. Psychol. Neurol., 40, 1-51.

254. Routtenberg, A., 1984. The CA3 pyramidal cell in the hippocampus: site of intrinsic expression and extrinsic control of memory formation. *In*: Neuropsychology of Memory, pp. 536-546. Edit. por L.R. Squire e N. Butters, Guilford, New York.

255. Ruela, C., Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1981. Cilia in stellate neurons of the rat cerebellum. Experientia, 37, 197-198.

256. Ruela, C., Matos-Lima, L., Sobrinho-Simões, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1979. The number of parallel fiber-Purkinje dendrite synapses. A morphometric evaluation. Experientia, 35, 1092.

257. Ruela, C., Matos-Lima, L., Sobrinho-Simões, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1980. Comparative morphometric study of cerebellar neurons. II. Purkinje cells. Acta Anat., 106, 270-275.

258. Rutledge, L.T., Chi, S.-I., Sutter, M.A., 1986. Effects of acute ethanol administration on neocortical inhibition. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 10, 506-511.

259. Rutledge, L.T., Sutter, M.A., Chi, S.-I., Gray, T.A., 1986. Effects of chronic ethanol treatment on neocortex. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 10, 512-516.

260. Sadler, M., Berry, M., 1983. Morphometric study of the development of Purkinje cell dendritic trees in the mouse using vertex analysis. J. Microsc., 131, 341-354.

261. Sakurai, Y., Sugimoto, S., 1985. Effects of lesions of prefrontal cortex and dorsomedial thalamus on delayed go/no-go alternation in rats. Behav. Brain Res., 17, 213-219.

262. Salaspuro, M.P., Lieber, C.S., 1980. Comparison of the detrimental effects of chronic alcohol intake in humans and animals. *In*: Animal Models in Alcohol Research, pp. 359-376. Edit. por K. Eriksson, J.D. Sinclair e K. Kiianmaa, Academic Press, London.

263. Schapiro, M.B., Rosman, N.P., Kemper, T.L., 1984. Effects of chronic exposure to alcohol on the developing brain. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6, 351-356.

264. Scheibel, A.B., 1979. The hippocampus: organizational patterns in health and senescence. Mech. Ageing Dev., 9, 89-102.

265. Scheibel, M.E., Scheibel, A.B., 1978. The methods of Golgi. *In*: Neuroanatomical Research Techniques, pp. 89-ll4. Edit. por R.T. Robertson, Academic Press, London.

266. Scheibel, M.E., Tomiyasu, U., Scheibel, A.B., 1977. The aging human Betz cell. Exp. Neurol., 56, 598--609.

267. Scheibel, M.E., Lindsay, R.D., Tomiyasu, U., Scheibel, A.B., 1975. Progressive dendritic changes in aging human cortex. Exp. Neurol., 47, 392-403.

268. Seress, L., Pokorny, J., 1981. Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. J. Anat., 133, 181-195.

269. Sholl, D.A., 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. J. Anat., 87, 387-407.

270. Siggins, G.R., Pittman, Q.J., French, E.D., 1987. Effects of ethanol on CA1 and CA3 pyramidal cells in the hippocampal slice preparation: an intracellular study. Brain Res., 414, 22-34.

271. Silva, C.A.R.A., 1987. Encefalopatias Alcoólicas. Prova Complementar de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.

272. Small, J.V., 1968. Measurements of section thickness. *In*: Proceedings 4th European Congress of Electron Microscopy, Vol. 1, p. 609. Edit. por D.S. Bocciarelli, Tipografia Poliglotta Vaticana, Roma.

273. Smit, G.J., Uylings, H.B.M., Veldmaat-Wansink, L., 1972. The branching pattern in dendrites of cortical neurons. Acta Morphol. Neerl.-Scand., 9, 253-274.

274. Smith, C.M., 1981. Pathophysiology of the alcohol withdrawal syndrome. Med. Hypoth., 7, 231-249.

275. Sousa-Pinto, A.A.G., 1972. A Área Auditiva no Córtex Cerebral. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.

276. Sousa-Pinto, A., 1973. The structure of the first auditory cortex (AI) in the cat. I.Light microscopic observations on its organization. Arch. Ital. Biol., 3, 112-137.

277. Squire, L.R., 1986. Mechanisms of memory. Science, 232, 1612-1619.

278. Stanfield, B.B., Cowan, W.M., 1979. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. J. Comp. Neurol., 185, 393-422.

279. Stensaas, L.J., 1967. The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. I. Fifteen milimeter stage, spongioblast morphology. J. Comp. Neurol., 129, 59-70.

280. Sterio, D.C., 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J. Microsc., 134, 127-136.

281. Steward, O., 1986. Lesion-induced synapse growth in the hippocampus. In search of cellular and molecular mechanisms. *In*: The Hippocampus, Vol. 3, pp. 65-111. Edit. por R.L. Isaacson e K.H. Pribram, Plenum Press, New York, London.

282. Strahler, A.N., 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. Trans. Am. Geophys. Un., 38, 913-920.

283. Swanson, L.W., 1979. The hippocampus: new anatomical insights. Trends Neurosci., 2, 9-12.

284. Swanson, L.W., 1981. A direct projection from Ammon's horn to the prefrontal cortex in the rat. Brain Res., 217, 150-154.

285. Swanson, L.W., Cowan, W.M., 1977. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. J. Comp. Neurol., 172, 49-84.

286. Tabakoff, B., Noble, E.P., Warren, K.R., 1979. Alcohol, nutrition and the brain. *In*: Nutrition and the Brain, Vol. 4, pp. 159-213. Edit. por R.J. Wurtman e J.J. Wurtman, Raven Press, New York.

287. Tanaka, D.,Jr., 1987. Neostriatal projections from cytoarchitectonically defined gyri in the prefrontal cortex of the dog. J. Comp. Neurol., 261, 48-73.

288. Tarrant, S.B., Routtenberg, A., 1977. The synaptic spinule in the dendritic spine: electron microscopic study of the hippocampal dentate gyrus. Tiss. Cell, 9, 461-474.

289. Tarrant, S.B., Routtenberg, A., 1979. Postsynaptic membrane and spine apparatus: proximity in dendritic spines. Neurosci. Lett., 11, 289-294.

290. Tavares, M.A.D.F., 1985. Alcoolização Crónica e Circuito Cerebeloso do Rato Adulto. Estudo Morfológico. Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto.

291. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1981. Cerebellar intranuclear inclusions in chronically alcoholized rats. Cell Tisse Res., 216, 227-230.

292. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1982. Alcohol-induced granule cell loss in the cerebellar cortex of the adult rat. Exp. Neurol.,78, 574-582.

293. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1982. Alterações neuronais no córtex cerebral no alcoolismo crónico. Estudo com o método de Golgi em material de autópsia. O Médico, 102, 107-113.

294. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1983. Lipofuscin granules in Purkinje cells after long-term alcohol consumption in rats. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 7, 302-306.

295. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1983. Mitochondrial changes in rat Purkinje cells after prolonged alcohol consumption. A morphological assessment. J. Submicrosc. Cytol., 15, 713-720.

296. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., 1984. Remodeling of the cerebellar glomeruli after long-term alcohol consumption in the adult rat. Brain Res., 309, 217-226.

297. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Cadete-Leite, A., 1986. Morphological evidence of climbing fiber plasticity after long-term alcohol intake. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 8, 481-485.

298. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Cadete-Leite, A., 1987. Chronic alcohol consumption reduces cortical layer volumes and the number of neurons of the rat cerebellar cortex. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 11, 315-319.

299. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Gray, E.G., 1983. Dendritic spine plasticity and chronic alcoholism in rats. Neurosci. Lett., 42, 235-238.

300. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Gray, E.G., 1983. A morphometric Golgi analysis of the Purkinje cell dendritic tree after long-term alcohol consumption in the adult rat. J. Neurocytol., 12, 939-948.

301. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Verwer, R.W.H., 1987. Synapses of the cerebellar cortex molecular layer after chronic alcohol consumption. Alcohol, 4, 109-116.

302. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Volk, B., 1986. Chronic alcohol consumption induces plastic changes in granule cell synaptic boutons of the rat cerebellar cortex. J. Submicrosc. Cytol., 18, 725-730.

303. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Barroca, H., Volk, B., 1985. Lipofuscin granules in cerebellar interneurons after long-term alcohol consumption in the adult rat. Anat. Embryol., 171, 61-69.

304. Tavares, M.A., Paula-Barbosa, M.M., Gray, E.G., Volk, B., 1985. Dendritic inclusions in the cerebellar granular layer after long term alcohol consumption in adult rats. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 9, 45-48.

305. Terry, R.D., De Teresa, R., Hansen, L.A., 1987. Neocortical cell counts in normal human adult aging. Ann. Neurol., 21, 530-539.

306. Tewari, S., Noble, E.P., 1979. Effects of ethanol on cerebral protein and ribonucleic acid synthesis. *In*: Biochemistry and Pharmacology of Ethanol, Vol. I, pp. 541-548. Edit. por E. Majchrowicz e E.P. Noble, Plenum Press, New York, London.

307. Turner, A.M., Greenough, W.T., 1985. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. Brain Res., 329, 195-203.

308. Uemura, E., 1980. Age-related changes in prefrontal cortex of Macaca mulatta: synaptic density. Exp. Neurol., 69, 164-172.

309. Uemura, E., 1985. Age-related changes in the subiculum of Macaca mulatta: dendritic branching pattern. Exp. Neurol., 87, 412-427.

310. Uylings, H.B.M., Parnavelas, J.G., Walg, H.L., 1981. Morphometry of cortical dendrites. *In*: Progress in Clinical and Biological Research, Vol.59B, Advances in the Morphology of Cells and Tissues, pp. 185--192. Edit. por E.A. Vidrio e M.A. Galina, A.R.Liss Inc., New York.

311. Uylings, H.B.M., Ruiz-Marcos, A., Van Pelt, J., 1986. The metric analysis of three-dimensional dendritic tree patterns: a methodological review. J. Neurosci. Meth., 18, 127-151.

312. Uylings, H.B.M., Smit, G.J., Veltman, W.A.M., 1975. Ordering methods in quantitative analysis of branching structures of dendritic trees. *In*: Advances in Neurology, Vol. 12, Physiology and Pathology of Dendrites, pp. 247-254. Edit. por G.W. Kreutzberg, Raven Press, New York.

313. Uylings, H.B.M., Van Eden, C.G., Hofman, M.A., 1986. Morphometry of size/volume variables and comparison of their bivariate relations in the nervous system under different conditions. J. Neurosci. Meth., 18, 19-37.

314. Uylings, H.B.M., Van Eden, C.G., Verwer, R.W.H., 1984. Morphometric methods in sexual dimorphism research on the central nervous system. *In*: Progress in Brain Research, Vol. 61, Sex Differences in the Brain. Relation Between Structure and Function, pp. 215-222. Edit. por G.F. DeVries, J.P. C. DeBruin, H.B.M. Uylings e M.A. Corner, Elsevier, Amsterdam.

315. Uylings, H.B.M., Kuypers, K., Diamond, M.C., Veltman, W.A.M., 1978. Effects of differential environment on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. Exp. Neurol., 62, 658-677.

316. Uylings, H.B.M., Verwer, R.W.H., Van Pelt, J., Parnavelas, J.G., 1983. Topological analysis of dendritic growth at various stages of cerebral development. Acta Stereol., 2, 55-62.

317. Valverde, F., 1970. The Golgi method. A tool for comparative strutural analysis. *In*: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, pp. 12-31. Edit. por W.J.H. Nauta e S.O.E. Ebbesson, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

318. Valverde, F., Facal-Valverde, M.V., 1988. Postnatal development of interstitial (subplate) cells in the white matter of the temporal cortex of kittens: a correlated Golgi and electron microscopic study. J. Comp. Neurol., 269, 168-192.

319. Van Eden, C.G., 1985. Postnatal development of rat prefrontal cortex. Tese de Doutoramento. Universidade de Amsterdam.

320. Van Eden, C.G., 1986. Development of connections between the mediodorsal nucleus of the thalamus and the prefrontal cortex in the rat. J. Comp. Neurol., 244, 349-359.

321. Van Eden, C.G., Uylings, H.B.M., 1985. Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. J. Comp. Neurol., 241, 253-267.

322. Van Eden, C.G., Uylings, H.B.M., 1985. Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. J. Comp. Neurol., 241, 268-274.

323. Van Eden, C.G., Uylings, H.B.M., Van Pelt, J., 1984. Sex-difference and left-right asymmetries in the prefrontal cortex during postnatal development in the rat. Dev. Brain Res., 12, 146-153.

324. Van Pelt, J., Verwer, R.W.H., 1983. The exact probabilities of branching patterns under terminal and segmental growth hypothesis. Bull. Math. Biol., 45, 269-285.

325. Van Pelt, J., Verwer, R.W.H., 1984. New classification methods of branching patterns. J. Microsc., 136, 23-34.

326. Van Pelt, J., Verwer, R.W.H., 1986. Topological properties of binary trees grown with order-dependent branching probabilities. Bull. Math. Biol., 48, 197-211.

327. Van Pelt, J., Verwer, R.W.H., Uylings, H.B.M., 1986. Application of growth models to the topology of neuronal branching patterns. J. Neurosci. Meth., 18, 153-165.

328. Vaughan, D.W., 1977. Age-related deterioration of pyramidal cell basal dendrites in rat auditory cortex. J. Comp. Neurol., 171, 501-516.

329. Verwer, R.W.H., De Groot, D.M.G., 1982. The effect of shape assumptions on the estimation of numerical density of synapses from thin sections. *In*: Progress in Brain Research, Vol. 55, Chemical Transmission in the Brain, pp. 195-203. Edit. por R.M. Buijs, P. Pévet e D.F. Swaab, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

330. Verwer, R.W.H., Van Pelt, J., 1983. A new method for the topological analysis of neuronal tree structures. J. Neurosci. Meth., 8, 335-351.

331. Verwer, R.W.H., Van Pelt, J., 1986. Descriptive and comparative analysis of geometrical properties of neuronal tree structures. J. Neurosci. Meth., 18, 179-206.

332. Victor, M., Adams, R.D., 1961. On the etiology of the alcoholic neurologic diseases with special reference to the role of nutrition. Am. J. Clin. Nutr., 9, 379-397.

333. Victor, M., Banker, B.Q., 1978. Alcohol and dementia. *In*: Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders, Aging, Vol. 17, pp. 149-172. Edit. por R. Katzman, R.D. Terry e K.L. Bick, Raven Press, New York.

334. Victor, M., Adams, R.D., Mancall, E.L., 1959. A restricted form of cerebellar cortical degeneration ocurring in alcoholic patients. Arch. Neurol., 1, 579-688.

335. Vijayan, V.K., 1986. Morphogenesis of the mossy fiber synapses in the hippocampus of the rhesus monkey. Dev. Brain Res., 25, 259-270.

336. Vogt, B.A., Peters, A., 1981. Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24 and 29. J. Comp. Neurol., 195, 603-625.

337. Vogt, B.A., Rosene, D.L., Peters, A., 1981. Synaptic termination of thalamic and callosal afferents in cingulate cortex of the rat. J. Comp. Neurol., 201, 265-283.

338. Volk, B., 1980. Paired helical filaments in rat spinal ganglia following chronic alcohol administration: an electron microscopic investigation. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 6, 143-153.

339. Volk, B., Maletz, J., 1985. Nuclear inclusions following chronic ethanol administration. An electron-microscopic investigation of the rat parietal cortex. Acta Neuropathol., 67, 170-173.

340. Von-Wartburg, J.P., 1980. Comparison of alcohol metabolism in humans and animals. *In*: Animal Models in Alcohol Research, pp. 427-443. Edit. por K. Eriksson, J.D. Sinclair e K. Kiianmaa, Academic Press, London.

341. Vrensen, G., Nunez Cardozo, J., 1981. Changes in size and shape of synaptic connections after visual training: an ultrastructural approach of synaptic plasticity. Brain Res., 218, 79-97.

342. Walker, D.W., Freund, G., 1971. Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. Physiol. Behav., 7, 773-778.

343. Walker, D.W., Freund, G., 1973. Impairment of timing behavior following prolonged alcohol consumption in rats. Science, 182, 597-599.

344. Walker, D.W., Hunter, B.E., 1978. Short-term memory impairment following chronic alcohol consumption in rats. Neuropsychologia, 16, 545-553.

345. Walker, D.W., Hunter, B.E., Abraham, W.C., 1981. Neuroanatomical and functional deficits subsequent to chronic ethanol administration in animals. Alcoholism: Clin. Exp. Res., 5, 267-282.

346. Walker, D.W., Hunter, B.E., Barnes, D.E., Riley, J.N., 1982. An animal model of alcohol-induced brain damage: a behavioral and anatomical analysis. *In*: Cerebral Deficits in Alcoholism, pp. 123-147. Edit. por D.A. Wilkinson, Addiction Research Foundation, Toronto.

347. Walker, D.W., Barnes, D.E., Riley, J.N., Hunter, B.E., Zornetzer, S.F., 1980. Neurotoxicity of chronic alcohol consumption: an animal model. *In*: Psychopharmacology of Alcohol, pp. 17-31. Edit. por M. Sandler, Raven Press, New York.

348. Walker, D.W., Barnes, D.E., Zornetzer, S.F., Hunter, B.E., Kubanis, P., 1980. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. Science, 209, 711-713.

349. Walsh, T.J., Schulz, D.W., Tilson, H.A., Schmechel, D.E., 1986. Colchicine -induced granule cell loss in rat hippocampus: selective behavioral and histological alterations. Brain Res., 398, 23-36.

350. Warren, M.A., Bedi, K.S., 1982. Synapse-to-neuron ratios in the visual cortex of adult rats undernourished from about birth until 100 days of age. J. Comp. Neurol., 210, 59-64.

351. Weibel, E.R., 1979. Stereological Methods, Vol. 1. Practical Methods for Biological Morphometry. Academic Press, London, New York, Toronto, Sidney, San Francisco.

352. Weinberg, J., 1984. Nutritional issues in perinatal alcohol exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6, 261-269.

353. Weiss, G.M., Pysh, J.J., 1978. Evidence for loss of Purkinje cell dendrites during late development: a morphometric Golgi analysis in the mouse. Brain Res., 154, 219-230.

354. West, J.R., Dewey, S.L., 1984. Mossy fiber sprouting in the fascia dentata after unilateral entorhinal lesions: quantitative analysis using computer -assisted image processing. Neuroscience, 13, 377-384.

355. West, J.R., Hodges-Savola, C.A., 1983. Permanent hippocampal mossy fiber hyperdevelopment following prenatal ethanol exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 5, 139-150.

356. West, M.J., Andersen, A.H., 1980. An allometric study of the area dentata in the rat and mouse. Brain Res. Rev., 2, 317-348.

357. West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., 1988. Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the disector. Brain Res., 448, 167-172.

358. West, M.J., Danscher, G., Gydesen, H., 1978. A determination of the volumes of the layers of the rat hippocampal region. Cell Tissue Res., 188, 345-359.

359. WHO memorandum: Nomenclature and classification of drug- and alcohol-related problems, 1981. Bull. World Health Organ., 59, 225-242.

360. Williams, R.S., Matthysse, S., 1983. Morphometric analysis of granule cell dendrites in the mouse dentate gyrus. J. Comp. Neurol., 215, 154-164.

361. Wimer, R.E., Wimer, C.C., Alameddine, L., 1988. On the development of strain and sex differences in granule cell number in the area dentata of house mice. Dev. Brain Res., 42, 191-197.

362. Yamada, K.M., Spooner, B.S., Wessels, W.K., 1971. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J. Cell Biol., 49, 614-635.

363. Yew, M.L.S., Moore, S., Biesele, M.M., 1981. Effects of chronic "moderate" alcohol consumption on vitamins A and C status of male Sprague-Dawley rats. Nutr. Rep. Intern., 23, 427-436.

364. Zucoloto, S., Rossi, M.A., Wright, N.A., 1984. Experimental models of chronic alcoholism, solid diet versus liquid diet. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 54, 387-391.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 17

MATERIAL E MÉTODOS 23

1. Animais e dietas 23
2. Técnica de perfusão. Distribuição geral e tratamento do material 24
3. Estudos quantitativos 27
4. Análise estatística dos resultados 38

RESULTADOS 39

1. Animais e dietas 39
2. Formação do hipocampo 40
   2.1. Observações qualitativas 40
   2.2. Estudos quantitativos 45
3. Córtex prelímbico 62
   3.1. Observações qualitativas 62
   3.2. Estudos quantitativos 67

DISCUSSÃO 87

1. Modelo experimental. Animais e dietas 87
2. Considerações metodológicas gerais 89
3. Formação do hipocampo 95
4. Córtex prelímbico 102
5. Considerações finais 108

RESUMO E CONCLUSÕES 113

SUMMARY AND CONCLUSIONS 117

BIBLIOGRAFIA 121

Composto e Impresso na LITOMÉDICA