

MARIA AMÉLIA DUARTE FERREIRA TAVARES

**ALCOOLIZAÇÃO CRÓNICA E CIRCUITO
CEREBELOSO DO RATO ADULTO**

ESTUDO MORFOLÓGICO

PORTO

1985

**ALCOOLIZAÇÃO CRÓNICA E CIRCUITO
CEREBELOSO DO RATO ADULTO**

ESTUDO MORFOLÓGICO

MARIA AMÉLIA DUARTE FERREIRA TAVARES

ALCOOLIZAÇÃO CRÓNICA E CIRCUITO CEREBELOSO DO RATO ADULTO

ESTUDO MORFOLÓGICO

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

PORTO

1 9 8 5

*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 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 João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim de Oliveira 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 Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Levy Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Pinheiro Coelho Hargreaves
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Doutor Vítor 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 Alvaro António Pinheiro Rodrigues
Doutor António Martins Gonçalves de Azevedo
Doutor António de Sousa Pereira
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Eduardo Esteves Pinto
Doutor Ernesto Borges Teixeira de Moraes
Doutor Francisco Alberto da Costa Pereira Viana
Doutor João Costa
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor José Afonso Dias Guimarães
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões

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

*(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto
— Decreto n.º 19 337, de 29 de Janeiro de 1931).*

O Decreto-Lei n.º 388/70, Art. 8.º, 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 resultados apresentados nesta dissertação foram publicados nos trabalhos:

- 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
- 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
- Paula-Barbosa M M, Tavares M A (1984) Neuritic plaque-like structures in the rat cerebellum following prolonged alcohol consumption. *Experientia* 40: 110-112

Nos dois primeiros coube-me a recolha de grande parte dos resultados a elaboração da primeira versão do manuscrito. No último, colaborei na recolha dos resultados, feita ao longo de anos de pesquisas, e participei na elaboração do manuscrito.

Ao Nuno Basilio

Ao Professor Doutor M. M. Paula-Barbosa

INTRODUÇÃO

No Instituto de Anatomia da Faculdade de Medicina do Porto tem-se vindo a prestar cuidadosa atenção à organização do córtex cerebeloso. Nos últimos 12 anos estudaram-se no Rato, no Gato e também no Homem aspectos particulares da organização fina do córtex do cerebelo, com a apreciação qualitativa e quantitativa dos seus diferentes constituintes (171, 172, 177, 209, 210). Tentou-se, deste modo, e no que ao cerebelo diz respeito, contribuir para o melhor conhecimento do substrato anatómico, no qual devem assentar as diferenças funcionais existentes entre os referidos vertebrados.

As dificuldades sentidas no decorrer de tão atractiva linha de investigação, nomeadamente as de ordem técnica, levaram a pensar maduramente sobre os caminhos a seguir. A experiência obtida abria, então, perspectivas a estudos experimentais de índole mais vasta centrados nessa área do sistema nervoso central já que, durante os anos decorridos, se tinham adquirido conhecimentos profundos da organização morfológica do cerebelo e dos padrões quantitativos do córtex cerebeloso normal, utilizáveis como elementos de comparação em situações experimentais. A posse desses conhecimentos dava ainda possibilidade de se abandonar uma investigação estritamente pura e enveredar por trabalhos com uma vertente aplicada muito franca, lançando mão da mesma exigente metodologia experimental, com todas as vantagens daí provenientes.

A morfologia dos neurónios do córtex cerebeloso e as suas conexões intracorticais são das melhor conhecidas no sistema nervoso. As primeiras descrições remontam a 1890 quando S. R. Cajal (194) mostrou, com impregnações argênticas, que o córtex cerebeloso possuía um número limitado de tipos de neurónios e um padrão estereotipado de organização arquitectónica. Com efeito, esta organização caracteriza-se basicamente pela uniformidade estrutural ao longo de toda a extensão do manto cortical. Em todo ele, a mesma disposição trilaminar facilmente identificável: camada granular (ou granulosa), camada das células de Purkinje (ou das células piriformes) e camada molecular. A primeira, mais profundamente situada, adjacente à substância branca, é povoada por elevado número de células de pequenas dimensões — as células granulares — o que lhe confere grande densidade celular. Para além das células granulares, esta camada do córtex cerebeloso possui outros neurónios, em menor número mas de maior volume — as células de Golgi.

A camada das células de Purkinje, considerada hoje como uma camada cortical independente, foi durante longo tempo descrita e caracterizada como a parte mais profunda da camada molecular (194). Nela se encontram os corpos celulares das células de Purkinje e os das células epiteliais de Golgi.

A camada molecular, adjacente à pia mater, é mais pobre em elementos celulares. Contém dois tipos de neurónios esparsos: as células em cesto, localizadas no seu 1/3 profundo, e as células estreladas, nos seus 2/3 superficiais. Parte substancial do seu volume é ocupado pelas arborizações dendríticas, quer das células referidas (estreladas e em cesto), quer pelas das células de Golgi e particularmente, pelas das células de Purkinje. As fibras paralelas, segmentos transversais dos axónios das células granulares, cruzam perpendicularmente estes dendritos. Os prolongamentos das células epiteliais de Golgi formam o suporte glial desta camada.

Reconhecem-se, no córtex cerebeloso, dois sistemas principais de fibras aferentes — o das fibras trepadoras e o das fibras musgosas. Directa, ou indirectamente, os estímulos por elas veiculados convergem num único sistema eferente —

o das células de Purkinje. As fibras trepadoras, que na sua maioria partem do complexo olivar inferior contralateral, entram em contacto sináptico com espinhas de forma globosa e quase sésseis dos ramos dendríticos primários e secundários das células de Purkinje. Por sua vez, as fibras musgosas, com origem úbiqua, ramificam-se profusamente na camada granular do córtex cerebeloso. Expandem-se aí em numerosos terminais de grandes dimensões, que constituem o núcleo central de arranjos sinápticos peculiares — os glomérulos cerebelosos. A sua disposição torna possível o contacto sináptico simultâneo do mesmo aferente com numerosos dendritos de células granulares, e menos frequentemente com dendritos das células de Golgi (72, 101). Por sua parte, os axónios das células granulares dirigem-se para a camada molecular onde se bifurcam; passam então a constituir as fibras paralelas, que correm ao longo do maior eixo das folhas cerebelosas. Dispõem-se perpendicularmente às arborizações dendríticas das células de Purkinje, estabelecem contactos sinápticos com as suas espinhas dendríticas e também, com as arborizações dendríticas das células de Golgi, estreladas e em cesto.

Para além destes dois sistemas de fibras aferentes outras há, umas catecolaminérgicas (40, 114) com origem no «locus coeruleus» (40, 167) e outras indolaminérgicas (39, 40), com origem nos diferentes núcleos do rafe e terminação dispersa no córtex cerebeloso (39, 40).

As estruturas referidas e os contactos sinápticos entre elas estabelecidos integram o circuito cerebeloso, basicamente organizado à volta das células de Purkinje cujos axónios são os únicos eferentes corticais. No circuito cerebeloso os contactos sinápticos estabelecidos pelos terminais das fibras trepadoras, musgosas e paralelas, são assimétricos e funcionalmente de tipo excitatório (96, 258), enquanto que os formados pelos terminais nervosos das células de Golgi, em cesto e estreladas, isto é, os terminais dos interneurónios cerebelosos, são simétricos e funcionalmente de tipo inibitório (96, 258).

O córtex cerebeloso constitui, deste modo, um sistema neuronal bem estruturado cujo «modus operandi» tem por

fundamento a regularidade e constância da sua unidade funcional — o circuito cerebeloso —. A integridade e estabilidade deste circuito, mais do que a de cada um dos seus elementos isoladamente, é indispensável à normal efectivação das operações que nele ocorrem. Esta afirmação é corroborada pelas observações de situações patológicas e experimentais nas quais, após lesão selectiva de elementos do referido circuito (108, 109, 143, 178, 187, 192, 231, 234, 235), ocorrem processos de reorganização estrutural tendentes a manter a constância do padrão morfológico atrás descrito, e que hoje se pensa obedecer a marcado determinismo genético (8, 230, 232, 233).

Porém, a reorganização estrutural desencadeada nestas circunstâncias pode não condicionar idêntica adaptação funcional do circuito por, muitas das vezes, não serem específicas (homólogas) (143, 234, 235, 287) as novas conexões estabelecidas entre os diferentes elementos.*

O conceito de alcoolismo crónico encontra-se, ainda hoje, insuficientemente definido (155, 228), o que se explica de algum modo pelo conflito existente entre conceitos e valores morais, sociais, legais, médicos e sanitários. No entanto, e de modo pragmático, deve considerar-se a existência de situação de alcoolismo crónico sempre que se verifiquem alterações patológicas e sociais ligadas ao consumo crónico e excessivo de álcool.

Na maioria das sociedades contemporâneas, o álcool etílico é a única substância capaz de provocar dependência e tolerância utilizada com total liberdade. Como diz Alonso-Fernandez (6) é a «droga institucionalizada».

Portugal, com um consumo anual de álcool «per capita» muito elevado, ocupa um dos primeiros lugares no consumo de bebidas alcoólicas da Europa, calculando-se que existam mais de 500 000 alcoólicos (80). Deve salientar-se que, entre

* Para revisão e recolha de bibliografia pormenorizada sobre a morfologia e fisiologia do cerebello ver 71, 72, 119, 147, 168, 194.

as causas mais frequentes de morbidade e mortalidade, em Portugal, ocupam lugar destacado as de foro hepático provocadas pelo álcool (9, 12, 217).

A investigação clínica da patologia associada ao alcoolismo crónico tem incidido especialmente ao nível do fígado, órgão onde se processa a quase totalidade do metabolismo do etanol (133, 134, 135, 137). No entanto, sabe-se que o consumo crónico e excessivo de álcool tem outros efeitos extremamente nocivos, causando alterações estruturais e funcionais em quase todos os órgãos da economia.

O sistema nervoso é particularmente afectado nas situações de alcoolismo crónico (20, 55, 84, 138, 264, 265). Admite-se mesmo que, de todas as drogas utilizadas pelo Homem capazes de produzir tolerância, o álcool etílico é a que apresenta efeitos mais devastadores neste sistema. Este facto é bem patente nos quadros clínicos de alcoolismo, onde avultam as manifestações de foro neurológico (4, 90), muito provavelmente relacionadas com as múltiplas e variadas alterações estruturais e funcionais do sistema nervoso (5, 36, 55, 76, 84, 140, 144, 164, 170, 247, 265, 266) presentes nos alcoólicos crónicos.

Das alterações do foro neurológico mais frequentes no alcoolismo, o síndrome cerebeloso é uma das mais evidentes, o que há muito levou a pensar na existência de marcada vulnerabilidade do cerebelo à acção deste neurotóxico (164, 207, 266). Tal hipótese foi corroborada por diversos estudos necrópsicos feitos em alcoólicos crónicos entre os quais sobressai o de Victor e col., publicado em 1959 (266), no qual se descrevem com todo o pormenor as alterações cerebelosas encontradas nestas circunstâncias. Outros se lhe seguiram (5, 76, 144): todos mencionam graves lesões do cerebelo caracterizadas por degenerescência neuronal, quase sempre limitada à parte superior do verme e aos lobos anteriores dos hemisférios, sendo a camada granular muito afectada.

As observações de material de autópsia e ainda as de índole puramente clínica, cedo se mostraram insuficientes para a avaliação pormenorizada da acção do álcool sobre a célula nervosa. Assim, era difícil, senão impossível, distin-

guir as alterações induzidas pelo consumo prolongado de álcool das dependentes de outros factores frequentemente a ele associados: a má-nutrição (244, 264, 265, 266), as condições ambientais e sociais (283), a idade (81, 284) e a hereditariedade (93, 162). Para ultrapassar estes condicionalismos foi necessário desenvolver métodos experimentais de alcoolização em animais de experiência, que permitissem a aplicação de técnicas impossíveis de se utilizar em material humano e viessem possibilitar mais correcta avaliação das alterações encontradas e dos seus factores condicionantes. Os resultados obtidos com estes modelos animais contribuíram de modo decisivo para demonstrar a existência de alterações neuropatológicas induzidas exclusivamente pelo consumo crónico e excessivo de álcool.

A maioria dos grupos de investigação que, com o recurso a estes métodos, tem estudado os efeitos do álcool sobre o sistema nervoso privilegiaram as questões de ordem fisiológica, psicológica e bioquímica (2, 3, 120, 122, 256, 270, 271), e hipovalorizaram os aspectos morfológicos. Destes, só os relacionados com os efeitos teratogénicos do etanol (18, 267) ou com a sua acção pós-natal (19, 216) durante a histogénese neuronal, mereceram alguma atenção.

No animal adulto, salientam-se os trabalhos de Walker e col. (201, 202, 272, 273, 274, 275) que focam os efeitos da administração crónica de álcool sobre a morfologia da chamada formação do hipocampo e do córtex cerebeloso do Rato e do Murganho. Os resultados obtidos no cerebelo (201, 272, 274, 275), pouco contribuíram para clarificar quais os efeitos resultantes do consumo crónico de álcool na organização desta área do sistema nervoso.

Tornava-se atractivo aprofundar as numerosas questões de foro morfológico deixadas em aberto nos trabalhos atrás referidos. Assim, projectaram-se, em 1978/79, estudos que visavam a análise a nível mais fino, dos efeitos induzidos por períodos prolongados de alcoolização no córtex cerebeloso do Rato adulto. A necessidade de recorrer a longos períodos de alcoolização (até 18 meses) obrigou a introduzir

várias modificações nos modelos experimentais mais usados de consumo crónico de álcool (48, 49, 136). No material assim obtido encontraram-se, no córtex do cerebelo do Rato adulto, diversas alterações morfológicas a nível subcelular.

Verificou-se a existência de corpos de inclusão nuclear nas células do córtex cerebeloso dos animais alcoolizados (245), tradutores de alterações marcadas no metabolismo dos ácidos nucleicos e da síntese proteica (120, 255, 256). Posteriormente e em situação semelhante, a par deste indicador celular de alteração do metabolismo dos ácidos nucleicos Dunmire e LaVelle (69) descreveram modificações na organização nucleolar das células de Purkinje.

Nestas mesmas células, observaram-se alterações qualitativas e quantitativas das mitocôndrias (249), dependentes do tempo de alcoolização. A exemplo do que acontece noutros órgãos, é de supor que estes achados traduzam graves perturbações induzidas pelo álcool nas cadeias metabólicas oxidativas localizadas a nível mitocondrial (37, 82, 208).

Encontrou-se ainda, não só nas células de Purkinje (248), mas também nos outros elementos celulares do córtex cerebeloso dos ratos submetidos a alcoolização crónica (251), aumento da deposição de lipofuscina. Este pigmento, com origem e função ainda controversas (32, 33, 165, 205, 215), mas hoje aceite como um dos indicadores mais precisos do envelhecimento neuronal (32, 104, 146, 196, 221), deposita-se maciçamente e de modo mais precoce nas células do córtex cerebeloso dos ratos alcoolizados (248, 251). Para além disso, constatou-se nos mesmos animais que os padrões morfológicos do pigmento (granular e lamelar) e a selectividade verificada na sua deposição eram idênticos aos que se observam no decurso do processo de senescência neuronal (104, 221). Estes resultados apoiam o parecer dos que defendem que a ingestão prolongada de álcool é um factor importante de envelhecimento prematuro do sistema nervoso central (26, 85, 86, 211).

A par destas alterações indicadoras de actividade degenerativa encontraram-se, no córtex cerebeloso dos animais alcoolizados, sinais de remodelação estrutural (250) — consequência das potencialidades plásticas patenteadas por estas

células — que explicam a existência paralela de zonas onde são francos os aspectos degenerativos, a par de outras onde predominam sinais de reorganização.

Comprovada a existência de alterações degenerativas marcadas e vislumbrada a presença simultânea de actividade remodeladora neuronal impunha-se pois, analisar globalmente os efeitos (degenerativos — reorganizativos) do consumo crónico de álcool na organização morfológica do circuito cerebeloso. A importância deste estudo assenta, como já foi dito, no facto do processamento final das operações corticais cerebelosas depender das conexões entre os seus diferentes elementos, isto é, da integridade do próprio circuito cerebeloso.

Nesta perspectiva, e recorrendo a métodos qualitativos e quantitativos, analisaram-se os diferentes elementos do circuito cerebeloso e as conexões entre eles estabelecidas.

Com cortes seriados de parafina estudaram-se, nos grupos alcoolizados e respectivos grupos testemunha, as variações volumétricas de cada uma das camadas do cerebelo.

Com o auxílio de cortes semifinos, obtiveram-se as densidades numéricas dos diferentes elementos celulares, tendo em vista o cálculo do número total de neurónios em cada camada do córtex do cerebelo, nos grupos alcoolizados e nos respectivos grupos testemunha.

Empregando o método de Golgi e a ultraestrutura estudaram-se, nos grupos alcoolizados e nos respectivos grupos testemunha:

- 1 — os principais aferentes corticais cerebelosos — fibras trepadoras e fibras musgosas;
- 2 — as células granulares e os seus prolongamentos celulares;

- 3 — as articulações sinápticas, ao nível dos glomérulos cerebelosos, das aferências corticais com as células granulares e com as de Golgi;
- 4 — a arborização dendrítica das células de Purkinje;
- 5 — a arborização dendrítica dos interneurónios cerebelosos;
- 6 — a organização estrutural do neurópilo da camada molecular, com particular realce para os contactos sinápticos estabelecidos pelos terminais das fibras paralelas com as espinhas das células de Purkinje e com os dendritos dos interneurónios (células de Golgi, em cesto e estreladas).

Em resumo, estudando sequencialmente os efeitos sectoriais do consumo crónico do álcool a nível dos diferentes elos do circuito cerebeloso, tentou obter-se uma visão alargada da acção deste neurotóxico na organização global do referido circuito, para assim tornar evidentes as alterações neuromorfológicas provavelmente relacionadas com a marcada disfunção cerebelosa existente nestas circunstâncias.

Um estudo desta índole, efectuado num circuito neuronal relativamente simples com número limitado de elementos celulares e dotados de um esquema geral de conexões relativamente bem definido, permitirá generalizar, ainda que especulativamente, para outros circuitos neuronais mais complexos, os efeitos nocivos do etanol sobre a respectiva morfologia, e deste modo abrir caminhos que conduzam a mais profunda compreensão das marcadas alterações funcionais induzidas pelo álcool em todo o sistema nervoso central.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e Dietas

As observações foram realizadas no cerebelo de ratos adultos, do sexo masculino, com 2 meses de idade e pesando 203 ± 13 g no início da experiência. Até aos fins de 1981, os animais foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, de Oeiras. Posteriormente utilizaram-se ratos da mesma espécie e estirpe, mas nascidos já no Instituto de Anatomia.

Dividiram-se os animais em 10 grupos de 6, colocando cada um dos ratos em gaiolas individuais. Em 5 dos grupos, os animais foram submetidos a 1, 3, 6, 12 e 18 meses de alcoolização e os dos outros 5 serviram de testemunha (controles), durante os mesmos períodos.

A alcoolização efectuou-se recorrendo a uma solução aquosa de etanol Merck a 20%, único tipo de bebida acessível aos animais a alcoolizar. Quer a solução alcoólica, quer a água fornecida aos animais testemunha continham suplementos vitamínicos (Vitamin Fortification Mixture, ICN Cleveland, 0,3 g/dl) e de sais minerais (Salt Mixture XIV, ICN Cleveland, 0,5 g/dl) (202, 273).

Nos animais submetidos à alcoolização, mediu-se diariamente, o peso dos alimentos ingeridos (dieta de laboratório própria para roedores) e o volume de solução alcoólica consumida que servia de base para o cálculo do consumo de álcool em gramas (1 dl de etanol—7,9 g) por quilograma de peso de animal e por dia. No dia seguinte, e após calcular o conteúdo calórico correspondente a essa quantidade

de álcool (1 g de etanol \simeq 7 kcal), fornecia-se aos respectivos animais testemunha, na água da bebida, igual número de calorias sob a forma de sacarose (1 g de sacarose \simeq 5 kcal) e alimentos em peso igual (g/dia) ao ingerido pelos animais alcoolizados.

Efectuava-se regularmente o registo de peso dos animais alcoolizados e respectivos animais testemunha.

2. Técnica de Perfusão, Distribuição Geral e Tratamento do Material

No fim de cada período experimental todos os animais (alcoolizados e testemunha), foram sacrificados : sob anestesia pelo éter foram perfundidos por via transcardíaca, durante 15-20 minutos, com um líquido fixador constituído pela mistura de 1% de glutaraldeído e 1% de formaldeído em tampão fosfato a 0,12 M, adicionado de lidocaína na concentração de 4‰. Portanto, com ligeiras modificações, empregaram-se as técnicas e as soluções descritas por Palay e Chan-Palay (168). Seguiu-se a remoção dos encéfalos dos animais. Isolados os cerebelos, deixavam-se mergulhados durante 2 horas no mesmo fixador.

Após este período, em 3-4 animais por grupo, o cerebelo era dividido sagitalmente através do verme; uma das metades incluía-se em parafina, para estudos de microscopia de luz. A outra metade era aproveitada do modo seguinte: da parte justa-medial do verme obtiveram-se alguns cortes parassagittais dos quais se colheram fragmentos dos lóbulos IV-VI (129) destinados a posterior observação ultrastrutural; o resto do verme e o hemisfério adjacente foram destinados à impregnação pelo método de Golgi. Nos animais restantes (3-2 por grupo), o cerebelo foi impregnado pelo método de Golgi com excepção dos lóbulos IV-VI do verme (129) destinados a observação ultrastrutural.

2.1. *Inclusão em Parafina*

Transferiram-se os hemi-cerebelos separados para inclusão em parafina, para formol a 10%; aí se conservaram cerca de 30 dias. Desidratados pelo álcool e após duas mudas de benzol, mantinham-se na estufa em parafina, durante a noite, até à sua inclusão, na manhã seguinte.

Deste material faziam-se cortes em série e parassagiais de 20 μm de espessura, com início no verme. O plano geral que presidiu à organização da montagem dos cortes, foi o seguinte: partindo da superfície de secção, os primeiros cortes, que não abrangiam a totalidade do verme, eram montados rigorosamente em série, até se obter um corte completo de toda a extensão do cerebelo; dos seguintes, rejeitavam-se os 4 primeiros cortes montando-se o 5.º, e assim se foi procedendo sucessivamente até à parte mais lateral do hemisfério cerebeloso onde, deixando os cortes de se apresentar contínuos, todos eles passavam a ser, de novo, montados em série. Porém, devido à irregularidade do córtex cerebeloso ou a problemas de ordem técnica, este esquema geral de montagem não pôde, por vezes, ser completamente seguido. Mas, nos casos em que os cortes do cerebelo não se apresentavam em perfeitas condições, montava-se o anterior ou o seguinte. Estas variações verificadas no decurso da montagem dos cortes levaram a registar, para cada animal e em cada lâmina, a sequência exacta dos cortes bem como o espaço existente entre eles (número de cortes rejeitados e espessura dos montados em série). De cada 1/2 cerebelo tratado deste modo, obtinham-se cerca de 70-80 cortes, posteriormente corados pela tionina.

2.2. *Método de Golgi*

A parte do cerebelo destinada a impregnação argêntica foi tratada pelo método de Golgi modificado por Valverde (260).

Os fragmentos a estudar eram colocados durante 7 dias num soluto aquoso de dicromato-ósmio (12 g de dicromato de potássio e 1 g de tetróxido de ósmio em 500 ml de água

destilada). Após passagem por solução aquosa de nitrato de prata a 0,75%, eram mantidos em solução idêntica durante 24 horas, decorridas as quais passavam à solução de dicromato-ósmio utilizada no primeiro passo. Aí se mantinham durante mais 6 dias após o que voltavam a nova solução de nitrato de prata durante 48 horas; nova passagem por dicromato-ósmio durante 5 dias. Por último, o material era imerso em nova solução de nitrato de prata durante mais 3 dias concluindo-se, assim, o processo de impregnação. Após breves passagens por álcool absoluto e terpinol seccionava-se o material num micrótomo de deslizamento, obtendo-se cortes com cerca de 100 μm de espessura, sempre segundo um plano perpendicular ao maior eixo das folhas do cerebelo. Passavam-se então por álcool absoluto, mergulhavam-se em terpinol, montavam-se em lâminas sem cola, lavavam-se com xilol e cobriam-se com uma camada de resina apropriada.

2.3. *Microscopia Electrónica*

Os diferentes passos seguidos com os fragmentos destinados a observação ultraestrutural pouco diferiam dos descritos por Palay e Chan-Palay (168) : após passagem pela solução de tampão eram imersos numa solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Para se obter uma agitação lenta e contínua utilizava-se um rotador mecânico. Após rápida passagem por álcool a 50% eram colocados, durante 1 hora, numa solução alcoólica a 70% de acetato de uranilo. Seguiu-se a desidratação do material fazendo-o passar por soluções alcoólicas progressivamente mais concentradas até ao álcool absoluto onde permaneciam 1 hora. Concluída a desidratação, permaneciam, durante 30 minutos, numa mistura de óxido de propileno e de resina TAAB em partes iguais, e noutra de óxido de propileno e de resina na proporção de 1 para 2, durante a noite. Eram então incluídos em resina.

Deste material obtiveram-se cortes semifinos e ultra-finos. Os primeiros foram corados pelo azul de toluidina;

os segundos, recolhidos em grelhas de malha de cobre, revestidas com «farmvar», eram duplamente contrastados pelo acetato de uranilo e pelo citrato de chumbo (197).

2.4. Determinação da Alcoolémia

Em 3 animais alcoolizados e em 3 animais testemunha, alheios às séries destinadas aos estudos microscópicos, foram determinados os níveis sanguíneos de álcool ao fim de 1 mês de experiência, após decapitação e colheita da quantidade de sangue necessária para a determinação da alcoolémia com um método enzimático (Boehringer-Manheim).

Em 2 ratos de cada grupo dos alcoolizados durante 12 e 18 meses e respectivos controlos incluídos nas séries destinadas às investigações histológicas, após heparinização e antes de iniciada a perfusão, retirou-se, com a ajuda de seringa apropriada, através da aorta abdominal, o sangue necessário para a determinação da alcoolémia.

3. Estudos Quantitativos

3.1. Análise Volumétrica do Cerebelo

Para a determinação do volume do cerebelo, do do córtex cerebeloso e das respectivas camadas, bem como do da substância branca (com os núcleos centrais nela incluídos) utilizaram-se os cortes do material incluído em parafina.

Os cálculos volumétricos foram baseados nas medidas das áreas dos cortes montados segundo a técnica já descrita. Para a obtenção destas áreas desenharam-se todos eles (ampliados 61×) com o auxílio de uma câmara clara. Nos traçados obtidos marcou-se o contorno de cada corte, a linha correspondente à camada das células de Purkinje, indicativa da transição entre as camadas molecular e granular, e ainda o limite entre a camada granular e a substância branca. As áreas das camadas molecular, granular e da subs-

tância branca de cada um dos cortes foram medidas com um planímetro.

A área da camada das células de Purkinje, em cada corte, foi determinada de modo diferente, por impossibilidade de se medir directamente com a ampliação utilizada. Para o seu cálculo comparou-se a camada das células de Purkinje, em cada corte, a um rectângulo, do qual um dos lados correspondia à altura média dos corpos celulares e o outro ao comprimento da linha indicativa do limite entre as camadas molecular e granular, medido em cada corte com o auxílio de um mapímetro. A altura média da camada das células de Purkinje foi calculada, em cada corte e em cada lóbulo cerebeloso, pela altura dos seus corpos celulares determinada com o auxílio de uma câmara clara e com a ampliação de $710\times$, em três locais distintos de cada folha (na sua parte mais convexa, na zona de transição para outra folha e num ponto equidistante entre estes dois) e calculando a média destes valores. A superfície da camada das células de Purkinje foi obtida, assim, em cada corte, pelo produto destes dois valores, reduzidos à sua dimensão real.

Para cálculo do volume entre cada dois cortes sucessivos, utilizou-se o método de aproximação aritmética das médias das áreas entre duas secções (261, 282). Considerou-se ser do tipo linear qualquer variação encontrada, em cada camada, entre as áreas de dois cortes consecutivos. Utilizou-se para a determinação do volume total V , de cada camada, a fórmula

$$V = \frac{1}{M^2} \sum_{i=1}^{n-1} \frac{A_i + A_{i+1}}{2} d_i$$

em que M representa a ampliação com que foram desenhados os cortes; n o número de cortes estudados; A_i a área do primeiro corte medido e A_{i+1} a do seguinte e d_i a distância que separa aqueles a que correspondem as áreas A_i e A_{i+1} . Esta distância depende, por um lado, da espessura do primeiro corte (A_i) e, por outro, do número de

cortes rejeitados entre as duas secções em estudo (A_i e A_{i+1}).

Para o cálculo do volume da camada das células de Purkinje e porque as áreas eram determinadas já na dimensão real, utilizou-se a fórmula

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{A_i + A_{i+1}}{2} d_i$$

Os volumes entre os diferentes cortes foram calculados parcelarmente e feito o respectivo somatório numa extensão de 4 500-5 000 μm a partir da parte mais lateral do hemisfério cerebeloso.

3.2. Número de Células do Córtex Cerebeloso

A determinação do número de células do córtex cerebeloso foi feita a partir de cortes semifinos.

De cada animal (6 por grupo) escolheram-se, ao acaso, 4 blocos de material e de cada um obtiveram-se 3-4 cortes semifinos, onde se visualizassem as três camadas do córtex cerebeloso. Era seleccionado, de cada bloco, o que apresentasse melhores condições para este tipo de estudo: ausência de soluções de continuidade ou de pregueamentos e boa coloração. Com o auxílio de uma câmara clara e com a ampliação de $180\times$, traçaram-se, para além do contorno do corte semifino, a linha correspondente à camada das células de Purkinje e o limite entre a camada granular e a substância branca.

Posteriormente, com uma ampliação de $710\times$, identificaram-se os diferentes tipos de células do córtex cerebeloso de acordo com as descrições de Palay e Chan-Palay (168). Aplicando métodos estereológicos para a determinação das suas densidades numéricas (N_V — número de células por unidade de volume), partiu-se do princípio de que em cada tipo celular os respectivos núcleos podiam ser comparados a

esferas de idêntica dimensão. Para tal determinação utilizou-se a fórmula de DeHoff e Rhines (66) modificada por Haug (103)

$$N_v = \frac{N_A}{\bar{D} + T - 2h}$$

em que N_A representa o número médio de perfis nucleares por unidade de área de cada camada, \bar{D} o diâmetro médio dos núcleos destas células, T a espessura dos cortes semifinos ($2 \mu\text{m}$); h é um factor de compensação para os perfis nucleares de pequenas dimensões, e por isso não identificáveis.

Para o cálculo do N_A mediu-se, com um planímetro, a área das camadas molecular e granular em cada corte semifino desenhado. De modo diferente se procedeu para o cálculo da área da camada das células de Purkinje que se obteve pelo produto do comprimento desta camada, em cada corte semifino, pela sua altura. Comprimento e altura foram calculados em cada corte de modo idêntico ao descrito atrás.

A contagem das células foi feita tendo como referência os núcleos celulares, facilmente identificáveis nos cortes semifinos corados pelo azul de toluidina. Nas células granulares a contagem dos perfis nucleares foi efectuada com o auxílio de uma área-teste rectangular ($12 \times 10,4 \text{ cm}$) com 50 segmentos de recta (278, 279). Para os restantes tipos celulares, este valor foi obtido contando-se todos os perfis nucleares localizados na área desenhada e medida.

Calculou-se o valor de \bar{D} , avaliando os diâmetros de cerca de 240 perfis nucleares de cada tipo neuronal e em cada grupo de animais (10 núcleos por bloco e por cada tipo de célula), desenhados à câmara clara com a ampliação de $710 \times$. O diâmetro médio de cada um dos perfis foi calculado a partir da medição do seu maior diâmetro e do da perpendicular a este e traçado pelo seu meio. Os valores obtidos foram corrigidos segundo Bach (13), tendo-se para tal estimado em $2 \mu\text{m}$ a espessura dos cortes semifinos. Foi atribuído a h o valor do diâmetro do menor perfil nuclear encontrado para cada tipo celular.

O número total de cada tipo celular do córtex cerebeloso (1/2 cerebelo) foi obtido multiplicando as densidades numéricas dos diferentes tipos celulares, em cada grupo, pelo valor médio do volume da parte selecionada de cada camada do córtex cerebeloso por grupo (volume de referência).

3.3. *Estudos Quantitativos com o Método de Golgi*

3.3.1. *Células granulares*

De cada animal desenharam-se, com auxílio de uma câmara clara e com ampliação de $640\times$, as primeiras 20-25 células granulares que apresentassem boa definição da árvore dendrítica, nomeadamente das suas partes mais distais. Em muitas delas era visível o axónio impregnado até à sua divisão na camada molecular. Quando, procedendo assim, se não obtinha o número suficiente de axónios (20-25 por animal) desenhavam-se estes, separadamente, desde que se vislumbresse o seu início e local de bifurcação. Nos axónios, marcavam-se as varicosidades ao longo do seu percurso ascendente e transversal (fibras paralelas).

Serviram os desenhos obtidos para a determinação:

- a) do número de ramificações — ramificações digitiformes — dos dendritos das células granulares (calculado, por célula, em cada grupo de animais);
- b) da densidade de ramos dendríticos em função da sua distância ao corpo celular. Seguiu-se o método dos círculos concêntricos de Sholl (223), que permite determinar o número médio de intersecções dendríticas por círculo, centrando-se estes no corpo celular. O 1.º círculo tinha um raio de $10\ \mu\text{m}$ e os seguintes, concêntricos, estavam afastados uns dos outros por uma distância de $5\ \mu\text{m}$;
- c) do número de varicosidades por unidade de comprimento de axónio das células granulares, obtido medindo-se com um mapímetro o comprimento dos segmentos ascendente e transversal dos axónios e contando-se as varicosidades que lhes correspondiam.

3.3.2. *Árvores dendríticas das células de Purkinje*

O estudo quantitativo das árvores dendríticas das células de Purkinje foi efectuado seguindo os métodos descritos por Weiss e Pysh (280).

Os critérios utilizados para a selecção das árvores dendríticas a analisar foram os seguintes: correcta orientação nas folhas do cerebello, boa qualidade de impregnação (pelo menos em metade da área), ramos periféricos bem definidos e sem sobreposição de árvores adjacentes que obscurecessem a sua correcta delimitação. As primeiras 8 células de cada animal que preenchessem estas condições eram desenhadas com auxílio de uma câmara clara.

Nos desenhos obtidos fez-se a determinação:

- a) da área dendrítica, tendo-se medido com um planímetro o contorno das arborizações dendríticas, ampliadas 350 ×;
- b) da densidade de ramificação dendrítica. As células de Purkinje com árvores dendríticas completamente impregnadas e ainda aquelas em que ficara bem impregnada pelo menos metade das arborizações dendríticas, foram desenhadas de modo estilizado com uma ampliação de 720 ×. A densidade de ramificação dendrítica (comprimento dendrítico por unidade de superfície da árvore dendrítica — L_A), foi determinada utilizando um método de intersecções por linhas, recorrendo a uma área-teste rectangular (18,0 × 15,3 cm), traçada em papel transparente, com 50 segmentos de recta de 17 mm de comprimento (278, 279) e empregando a fórmula de Saltikov (214)

$$L_A = \frac{\pi}{2} \times P_L$$

em que P_L representa o número de intersecções por unidade de comprimento de linha da área-teste;

- c) do comprimento dendrítico total, parâmetro secundário, obtido pela multiplicação do valor da área dendrítica pelo da densidade de ramificação dendrítica (280);
- d) do número de ramos dendríticos. De cada animal, as primeiras 5 células de Purkinje desenhadas de modo estilizado e que obedeciam às condições atrás estabelecidas, foram escolhidas para ordenação e contagem dos ramos dendríticos. A ordenação foi feita segundo o método centrípeto de Strahler (22, 259). De acordo com este método, atribuíam-se aos ramos dendríticos terminais o número de ordem 1, aumentado de 1 unidade sempre que dois segmentos da mesma ordem se juntavam. Quando convergiam dois segmentos de ordem diferente prevalecia o número de ordem mais elevado. Esta ordenação permitiu calcular o número total de ramos dendríticos de cada célula e ainda o seu número por cada ordem;
- e) do número de espinhas dendríticas, contado por célula numa extensão de 10 μm , em 12 ramos apicais e em 12 ramos basilares. As contagens foram efectuadas com a ampliação de 720 \times e incidiram apenas nas visualizadas no mesmo plano focal.

3.3.3. *Árvores dendríticas dos interneurónios — células de Golgi, células em cesto e células estreladas*

De cada animal, com o auxílio de uma câmara clara, desenharam-se, de modo estilizado e ampliadas 350 \times , as árvores dendríticas de 5 a 8 células em cesto e número idêntico de células estreladas do 1/3 superficial da camada molecular. Para esse fim, foram seleccionadas as primeiras que apresentassem arborizações dendríticas bem impregnadas, não se tendo excluído aquelas que mostravam pequenas soluções de continuidade ou fracturas dos seus ramos.

Para o estudo das ramificações dendríticas destes tipos celulares seguiu-se o método dos círculos concêntricos de Sholl (223), afastados de 20 μm para análise das árvores dendríticas das células em cesto e de 10 μm para as das células estreladas, determinando-se o número médio de intersecções dendríticas por célula. Obteve-se, assim, para cada um destes tipos celulares a densidade dos ramos dendríticos em função da sua distância ao pericário.

O número de células de Golgi bem impregnadas era muito reduzido. Por isso apenas se procedeu ao estudo qualitativo destes elementos.

3.4. *Estudos Quantitativos Ultraestruturais*

3.4.1. *Camada granular (glómérulo cerebeloso)*

Para o estudo dos glómérulos cerebelosos, foram escolhidos, ao acaso, 5 blocos de cada animal. De cada bloco fizeram-se cortes semifinos; uma vez identificada a camada granular, talharam-se as respectivas pirâmides e obtiveram-se cortes ultrafinos, com espessura compreendida entre 70-80 nm (181). De cortes de cada bloco tiraram-se, ao acaso, 3 fotografias da camada granular tendo, no entanto, havido o cuidado de fotografar áreas que contivessem mais de 50% de neurópilo. Obtiveram-se, deste modo, 90 fotografias por grupo, onde se individualizaram cerca de 100 glómérulos cerebelosos.

Os cortes foram fotografados com uma ampliação primária de 3 000 \times . A ampliação final, em provas de papel, foi de 9 000 \times . Verificou-se, inicialmente, a ampliação exacta através de uma grelha graduada fotografada e ampliada de forma idêntica aos cortes ultrafinos. Tendo-se verificado que a variação máxima na ampliação final não excedia em 5% os valores médios, utilizou-se o valor de 9 000 \times em todos os cálculos.

Os critérios utilizados para a delimitação dos glómérulos cerebelosos e identificação dos seus diferentes constituintes foram os descritos por Palay e Chan-Palay (168).

Para facilitar a análise quantitativa dos diferentes componentes glomerulares individualizaram-se, com cores diferentes ou tracejados, os perfis dos terminais das fibras musgosas, os dos dendritos das células granulares, os dos terminais nervosos das células de Golgi e ainda os dos prolongamentos gliais. Rejeitaram-se todos os perfis que não eram susceptíveis de correcta identificação.

A superfície dos perfis glomerulares, assim como a percentagem (fracção) do volume do glomérulo ocupado pelos terminais das fibras musgosas, pelos dendritos das células granulares, pelos perfis gliais e pelos terminais das células de Golgi (densidades volumétricas — V_v), foram determinadas de acordo com as técnicas escritas por Weibel (278, 279). Utilizou-se uma área-teste quadrada de 15 cm de lado, traçada em papel transparente, contendo 400 pontos definidos pela intersecção de duas fiadas de linhas paralelas entre si e afastadas de 0,75 cm (278, 279).

O número total de sinapses por perfil glomerular foi calculado pela contagem do número de contactos sinápticos entre os diferentes componentes do glomérulo cerebeloso. Quantificaram-se, separadamente, as sinapses estabelecidas pelos terminais das fibras musgosas com os dendritos das células granulares e com os das células de Golgi.

3.4.2. *Camada molecular*

a) Terminais das fibras trepadoras

De cada animal (6 por grupo) foram escolhidos, ao acaso, 4 blocos. Fotografou-se a primeira área observada, no 1/3 profundo da camada molecular, que contivesse um tronco dendrítico primário ou secundário de uma célula de Purkinje, tendo havido sempre o cuidado de abranger o neurópilo circundante numa extensão de, pelo menos, 6-8 μm . Quando necessário, efectuaram-se montagens fotográficas dos troncos dendríticos. Obtiveram-se, assim, 24 fotografias ou número equivalente de montagens fotográficas por grupo. Todos os cortes foram fotografados com uma ampliação primária de

3 000 \times e ampliação final de 9 000 \times . A verificação da ampliação foi feita como em 3.4.1.

Em cada fotografia, ou montagem, definiu-se uma área limitada, por um lado, pela membrana do dendrito, e pelo outro, por uma linha que, acompanhando o perfil dendrítico, distava deste 4 μm , área essa na qual se marcaram, os perfis dos terminais das fibras trepadoras, identificadas de acordo com as descrições de Palay e Chan-Palay (168).

A fracção do volume desta zona da camada molecular, ocupada pelas fibras trepadoras (densidade volumétrica — V_v), foi determinada de acordo com as técnicas descritas por Weibel (278, 279). Utilizou-se a mesma área-teste já referida em 3.4.1.

b) Organização estrutural do neurópilo da camada molecular

De cada animal foram escolhidos, ao acaso, 5 blocos e de cada um fizeram-se cortes semifinos. Identificada a camada molecular obtiveram-se cortes ultrafinos dos seus 2/3 superficiais, dos quais e por cada bloco se fizeram 2 fotografias em 2 locais distintos, ao acaso, evitando-se, no entanto, as áreas ocupadas por troncos dendríticos de grande porte e ainda, as que contivessem corpos celulares de interneurónios e de células gliais.

Os cortes foram fotografados com uma ampliação primária de 6 000 \times (ampliação final de 18 000 \times). A verificação da ampliação foi feita como já se referiu em 3.4.1.

A identificação dos diferentes elementos do neurópilo da camada molecular foi feita de acordo com as descrições de Palay e Chan-Palay (168) e a caracterização dos diferentes constituintes dos contactos sinápticos conforme os critérios definidos por Gray (98) e Pappas e Waxman (169).

Nas fotografias ampliadas 18 000 \times , mediu-se a extensão dos primeiros 40 perfis das sinapses, observados em cada animal, entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje. Mediram-se ainda todos os perfis sinápticos entre as fibras paralelas e os dendritos dos inter-

neurónios. Como referência para essas medidas foi considerado o espessamento pós-sináptico.

Marcaram-se, de seguida, as sinapses com tinta para facilitar o cálculo do seu número por unidade de superfície da camada molecular, empregando as técnicas descritas por Weibel (278, 279). Utilizou-se uma área-teste rectangular (23,8 × 17,7 cm), traçada em papel transparente, com segmentos de recta de 17 mm de comprimento (278, 279). Com a mesma área-teste, determinou-se ainda a densidade de superfície dos contactos sinápticos (superfície sináptica por unidade de volume da camada molecular — S_v), utilizando-se a fórmula

$$S_v = \frac{2 I}{L_T}$$

em que I representa o número de intersecções dos perfis dos contactos sinápticos com as linhas da área-teste e L_T o comprimento total destas (279).

Para o estudo dos terminais das fibras paralelas e dos prolongamentos gliais assinalaram-se, de modo diferente, estes perfis nas fotografias ampliadas 18 000 ×. Determinou-se a fracção do volume da camada molecular ocupada pelos terminais das fibras paralelas e pelos prolongamentos gliais (densidades volumétricas — V_v), utilizando a mesma área-teste e as técnicas descritas por Weibel (278, 279).

O diâmetro médio das cabeças das espinhas dendríticas das células de Purkinje foi calculado, nos primeiros 40 perfis de espinhas dendríticas observados em cada animal, medindo o seu maior diâmetro e o perpendicular a este traçado pelo seu meio.

Dos animais alcoolizados durante 12 e 18 meses e dos respectivos animais testemunha, fotografou-se mais um campo da camada molecular (nos cortes ultrafinos do primeiro bloco trabalhado, com uma ampliação primária de 10 000 × e final de 30 000 ×): fotografia tirada numa zona da camada molecular onde fosse elevado o número de sinapses entre os terminais das fibras paralelas e as espinhas das células de Purkinje.

Avaliaram-se ainda os ângulos de curvatura destas sinapses nas fotografias ampliadas $30\,000\times$. Para tal, com auxílio de lupa apropriada, fizeram-se as seguintes medidas: 1) comprimento do contacto sináptico (espessamento pós-sináptico); 2) comprimento a da corda traçada entre as extremidades da densidade pós-sináptica e 3) comprimento b da linha perpendicular partindo do meio da referida corda até à face interna do espessamento pós-sináptico. Com estes valores, considerando os contactos sinápticos como superfícies circulares planas (52, 160, 269), obteve-se para cada perfil sináptico, uma estimativa do raio r do arco sináptico. Utilizou-se a fórmula seguinte, modificação da apresentada por Cooke e col. (52).

$$r = \frac{(a/2)^2 + b^2}{2b}$$

A partir do valor de r e de a calculou-se o valor α de metade do ângulo de curvatura do arco sináptico utilizando a fórmula

$$\alpha = \text{arc sen } \frac{a/2}{r}$$

Para o cálculo da densidade numérica das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje — número de sinapses por unidade de volume da camada molecular — N_v —, recorreu-se a um processo discreto de «unfolding» (desdobramento) (278), utilizando a divisão de classes proposta por Goldsmith (91) e Cruz-Orive (58). Introduziram-se ainda correcções para os perfis perdidos (13) e entrou-se também em linha de conta com a espessura do corte, avaliada pela sua cor de interferência em 70-80 nm (181).

O processo de desdobramento consiste, basicamente, na transformação de uma distribuição de frequências de tamanhos de perfis $\{ f(i) \}$ numa outra de frequências de tamanhos de objectos $\{ f(j) \}$ (278), uma vez conhecida, ou admitida, uma forma apropriada para estes. No caso

presente, como já foi dito, os contactos sinápticos foram comparados a discos circulares planos (52, 160, 269).

Para a análise estereológica das sinapses recorreu-se a métodos computadorizados, utilizando a fórmula inversa apresentada por Weibel — fórmula 5.59 (278) — que permitiu obter o diâmetro médio e a superfície média dos discos sinápticos.

Para determinar o valor correcto de N_V seguiu-se a técnica de Bach (13) de correcção do número de perfis perdidos (para evitar valores de N_V negativos nas classes de tamanho mais pequeno), e entrou-se em linha de conta com o diâmetro médio dos discos sinápticos, a espessura dos cortes e o valor encontrado para N_A das sinapses (número de perfis sinápticos por unidade de superfície), aplicando a fórmula de Abercrombie (1).

Seguiu-se idêntico processo para o cálculo da densidade numérica das sinapses entre as fibras paralelas e os dendritos dos interneurónios, mas não se avaliou o ângulo de curvatura destas sinapses.

Para comparar as eventuais diferenças existentes nas distribuições dos tamanhos dos discos sinápticos fez-se novo desdobramento, utilizando uma distribuição de frequências cumulativas para cada amostra, com os mesmos intervalos para ambas as distribuições.

4. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados obtidos, para cada grupo de animais em cada período de experiência, foram sempre expressos em média \pm desvio padrão.

Na apreciação estatística dos volumes das camadas do cerebelo efectuou-se, para cada grupo, uma análise de variância separando animais e camadas, utilizando-se a soma dos quadrados residuais para a comparação de médias através do teste «t» de Student.

Para cada período de experiência, foi utilizado o teste «U» de Mann-Whitney para a comparação dos resultados

obtidos nos animais alcoolizados com os dos respectivos animais testemunha.

As análises estatísticas de tipo diferente das referidas encontram-se expressas nos respectivos quadros de resultados.

Consideraram-se as diferenças significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Animais e Dietas

A quantidade média diária de álcool ingerida pelos animais submetidos a alcoolização foi de $9 \pm 1,3$ g/kg de peso. No início da experiência (durante o 1.º mês) e na sua fase final (após 17 meses) verificou-se um consumo mais reduzido, embora não diferisse significativamente daqueles valores médios.

O peso médio dos animais no início da experiência era de 203 ± 13 g; manteve-se inalterado durante o primeiro mês de ingestão de álcool, ao contrário do que se verificou nos animais testemunha que aumentaram cerca de 12 g no mesmo intervalo de tempo. A partir de então, nos grupos de animais alcoolizados registou-se um aumento médio de peso corporal de $10,1 \pm 3$ g/mês e nos testemunha de $11,8 \pm 2$ g/mês. Porém, este aumento ponderal não era suficiente para que o peso dos animais alcoolizados e o dos respectivos animais testemunha diferisse significativamente no fim de cada período experimental.

Os pesos médios dos cerebelos dos animais alcoolizados e os dos respectivos controlos, medidos após 2 horas de permanência no fixador, não se mostraram significativamente diferentes: 310 ± 60 mg para os grupos alcoolizados e 345 ± 35 mg para os grupos de controlo. As diferenças mais acentuadas verificaram-se após os 12 e 18 meses de alcoolização, sem que contudo se mostrassem realmente significativas.

Nos animais alcoolizados os níveis sanguíneos de álcool encontrados no fim do primeiro mês, variaram entre 90-120 mg/dl (controles 0 mg/dl); aos 12 e 18 meses entre 80-120 mg/dl (controles 0 mg/dl).

2. Volumes das Camadas do Cerebelo

2.1. Observações Qualitativas

Da comparação da morfologia exterior dos cerebelos e nomeadamente da disposição dos lóbulos e sulcos (106, 129), entre os animais alcoolizados e os respectivos animais de controlo, não ressaltaram diferenças apreciáveis apesar de se terem reconhecido pequenas variações individuais mais acentuadas nos animais alcoolizados.

O padrão de foliação observado nos cortes obtidos no verme e nos hemisférios (Fig. 1) era idêntico nos ratos alcoolizados e nos respectivos animais testemunha, se bem que, após 12 meses de alcoolização, as fissuras cerebelosas, os espaços interlobulares e interlobares se tivessem alargado um pouco. A partir dos 12 meses, era evidente a diminuição da área dos cortes do verme nos grupos dos animais alcoolizados. A observação das diversas camadas do cerebelo nos animais alcoolizados e respectivos controlos, não revelou elementos dignos de especial referência.

2.2. Estudo Quantitativo

Não se encontraram diferenças significativas, entre o volume do cerebelo dos animais alcoolizados e o dos respectivos controlos, ao fim de 1 mês de alcoolização, mas aos 3 meses verificava-se já uma redução de cerca de 8% daquele volume nos animais alcoolizados e maior ainda nos subsequentes períodos de experiência.

Os resultados respeitantes à quantificação dos volumes das camadas do cerebelo incluindo o da substância branca, encontram-se resumidos no Quadro 1.

QUADRO 1

Volumes das Camadas do Cerebelo

	1 MESES T* (2)***	A** (2)	3 MESES T (4)	A (4)	6 MESES T (2)	A (2)	12 MESES T (2)	A (2)	18 MESES T (4)	A (2)
Camada molecular (mm ³)	15,34 ± 0,11	16,17 ± 0,06	15,12 ± 1,22	13,95 ± 0,44	16,03 ± 1,99	13,17 ± 0,07	16,66 ± 1,12	11,61 ± 2,34	18,69 ± 3,60	13,89 ± 1,86
	n.s.***		n.s.		p<0,02		p<0,005		p<0,005	
Camada das células de Purkinje (mm ³)	1,91 ± 0,02	1,83 ± 0,12	1,95 ± 0,33	1,63 ± 0,06	1,94 ± 0,08	1,54 ± 0,08	1,96 ± 0,16	1,59 ± 0,21	2,02 ± 0,22	1,75 ± 0,27
	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
Camada granular (mm ³)	14,09 ± 0,08	14,66 ± 0,60	14,01 ± 1,58	12,95 ± 0,59	13,96 ± 1,92	10,95 ± 0,11	15,20 ± 1,11	10,55 ± 1,85	15,46 ± 1,92	11,90 ± 1,23
	n.s.		p<0,05		p<0,01		p<0,01		p<0,025	
Substância branca (mm ³)	16,81 ± 1,43	17,32 ± 2,04	15,44 ± 1,73	14,65 ± 0,56	15,54 ± 1,69	11,93 ± 1,29	17,90 ± 3,14	12,71 ± 1,47	20,38 ± 2,16	15,66 ± 3,32
	n.s.		n.s.		p<0,005		p<0,05		p<0,01	

* T — Grupo de animais testemunha.

** A — Grupo de animais alcoolizados.

*** () — Número de cerebelos estudados.

**** n. s. — Não significativo.

Como aí se pode verificar em relação aos volumes das camadas do córtex cerebeloso e da substância branca, encontraram-se diferenças significativas no volume da camada granular, após 3 meses de alcoolização (redução volumétrica de 7,6%). Porém, no resto do órgão não se mostraram ainda diferenças significativas após este período de experiência.

Já nos animais submetidos a períodos de 6, 12 e 18 meses de alcoolização, encontraram-se diferenças volumétricas que atingiam globalmente as camadas molecular e granular e a substância branca. Pelo contrário, no que respeita à camada das células de Purkinje, embora se tivessem verificado reduções volumétricas percentuais aos 3, 6, 12 e 18 meses de consumo de álcool, as diferenças registadas nos volumes médios desta camada não foram estatisticamente significativas.

3. Número de Células do Córtex Cerebeloso

Apresentam-se nos Quadros 2, 3, 4, 5 e 6, os valores das densidades numéricas, obtidas em cortes semifinos, das células do córtex cerebeloso, e ainda os números totais dessas mesmas células.

Pela análise do Quadro 2, verifica-se que a densidade numérica das células de Purkinje não variou significativamente. Pelo contrário, o número total destes neurónios, aos 18 meses de alcoolização, era significativamente inferior nos animais alcoolizados.

Não se encontraram diferenças significativas nos valores das densidades numéricas e nos números totais das células granulares dos grupos submetidos a alcoolização durante 1 e 3 meses. Já nos grupos alcoolizados durante 6, 12 e 18 meses se evidenciou redução significativa das densidades numéricas e do número total destas células (Quadro 3).

Ainda na camada granular, a densidade numérica das células de Golgi não apresentava alterações significativas nos grupos alcoolizados, até aos 12 meses. Porém, aos 18 meses,

este valor era maior nos animais alcoolizados. No entanto, o número total das células de Golgi não apresentava diferenças significativas ao longo da experiência (Quadro 4). Refira-se que, para o cálculo das densidades numéricas e dos números totais das células de Golgi, não se levaram em conta os diversos subtipos celulares desta população (168, 194).

A análise quantitativa dos números de interneurónios da camada molecular, apresenta-se no Quadro 5. Não se encontraram diferenças significativas nas suas densidades numéricas, quando analisadas independentemente do tipo celular. No entanto, em consequência da redução volumétrica desta camada, o seu número total encontrava-se significativamente reduzido aos 12 e 18 meses de alcoolização. A análise isolada dos tipos de interneurónios mostrou que se as células em cesto não apresentavam alterações da densidade numérica e do seu número total até aos 6 meses de consumo de álcool, o mesmo já não acontecia aos 12 e 18 meses de experiência. Havia então diminuição significativa daqueles valores. Quanto às células estreladas do 1/3 superficial da camada molecular não se apuraram diferenças significativas da sua densidade numérica mas o seu número total estava significativamente diminuído a partir dos 6 meses de administração de álcool.

Relativamente às densidades numéricas das células epiteliais de Golgi, encontrou-se aumento do seu valor aos 12 meses de alcoolização o que, todavia, não se mantinha no grupo de animais alcoolizados estudados aos 18 meses. Quanto ao número total destas células, encontrava-se diminuído aos 6 meses de alcoolização sem que se tivessem encontrado diferenças significativas nos restantes períodos experimentais. Para estes factos, apresentados no Quadro 6, e de algum modo inesperados, não se encontrou explicação.

QUADRO 2

Número de Células de Purkinje do Córtex Cerebeloso

	1 MES		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
N _v ** (n.º/0,001 mm ³)	54,5 ± 4,9	56,8 ± 10,7	48,1 ± 6,8	52,2 ± 13,0	48,6 ± 6,2	52,9 ± 6,1	49,9 ± 8,2	59,3 ± 10,3	53,9 ± 8,0	49,9 ± 8,5
	n.s.****		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
NT*** (×10 ³)	100 ± 9	108 ± 20	94 ± 13	85 ± 21	94 ± 12	81 ± 9	98 ± 16	94 ± 16	109 ± 16	87 ± 15
	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		p < 0,05	

* () — Número de animais estudados em todos os grupos.

** N_v — Número por unidade de volume.

*** NT — Número total por 1/2 cerebelo.

**** n. s. — Não significativo.

QUADRO 3

Número de Células Granulares do Córtex Cerebeloso

	1 MES T A (6)	3 MESES T A	6 MESES T A	12 MESES T A	18 MESES T A
N _V (n.º/0,001 mm ³)	1938 ± 1871 ± 215 120 n.s.	1797 ± 1905 ± 139 346 n.s.	1805 ± 1512 ± 121 140 p < 0,02	1969 ± 1489 ± 244 177 p < 0,02	1818 ± 1316 ± 171 117 p < 0,002
NT (×10 ³)	27308 ± 27425 ± 3026 1759 n.s.	25179 ± 24666 ± 1941 4482 n.s.	25193 ± 16551 ± 1692 1532 p < 0,002	29937 ± 16313 ± 3706 1940 p < 0,002	28112 ± 15554 ± 2651 1344 p < 0,002

QUADRO 4

Número de Células de Golgi do Córtex Cerebeloso

	1 MES	3 MESES	6 MESES	12 MESES	18 MESES
	T	T	T	T	T
	A	A	A	A	A
	(6)				
N _V (n.º/0,001 mm ³)	8,1 ± 1,4 8,0 ± 3,8 n.s.	8,3 ± 1,9 9,1 ± 2,6 n.s.	8,5 ± 1,8 7,3 ± 2,8 n.s.	5,7 ± 3,0 6,8 ± 2,2 n.s.	5,0 ± 2,2 8,3 ± 2,0 p < 0,05
NT (×10 ³)	114 ± 20 118 ± 56 n.s.	116 ± 27 118 ± 34 n.s.	119 ± 25 80 ± 31 n.s.	87 ± 46 72 ± 23 n.s.	78 ± 34 99 ± 23 n.s.

QUADRO 5

Número de Interneurónios da Camada Molecular do Córtex Cerebeloso

		1 MESES	3 MESES	6 MESES	12 MESES	18 MESES
		T	T	T	T	T
		A	A	A	A	A
		(6)				
Interneurónios da camada molecular	N _V (n./0,001 mm ³)	56,1 ± 9,6 n.s.	84,6 ± 9,4 n.s.	64,3 ± 13,1 n.s.	80,4 ± 10,9 n.s.	67,9 ± 11,8 71,2 ± 6,2 n.s.
	NT (×10 ³)	860 ± 146 n.s.	1279 ± 141 n.s.	1031 ± 209 n.s.	1339 ± 182 p<0,002	1268 ± 221 p<0,05
Células em cesto	N _V (n./0,001 mm ³)	91,1 ± 12,2 n.s.	107,2 ± 23,4 n.s.	91,1 ± 16,9 n.s.	96,6 ± 20,6 p<0,05	94,1 ± 13,7 75,6 ± 10,1 p<0,05
	NT (×10 ³)	466 ± 62 n.s.	507 ± 66 n.s.	487 ± 90 n.s.	536 ± 115 p<0,002	586 ± 85 350 ± 47 p<0,002
Células estreladas (1/3 superficial)	N _V (n./0,001 mm ³)	47,1 ± 13,1 n.s.	89,9 ± 24,4 n.s.	76,0 ± 12,1 n.s.	90,0 ± 21,3 n.s.	84,4 ± 15,9 78,3 ± 12,9 n.s.
	NT (×10 ³)	241 ± 67 n.s.	453 ± 123 n.s.	406 ± 65 p<0,002	500 ± 118 p<0,004	526 ± 99 362 ± 60 p<0,02

QUADRO 6
Número de Células Epiteliais de Golgi do Córtex Cerebeloso

	1 MES T A (6)	3 MESES T A	6 MESES T A	12 MESES T A	18 MESES T A
N _V (n.º/0,001 mm ³)	315,2 ± 46,8 38,7 n.s.	301,5 ± 35,6 300,4 ± 40,1 n.s.	319,1 ± 50,5 315,1 ± 41,6 n.s.	249,1 ± 34,8 324,6 ± 31,9 p < 0,004	263,5 ± 31,7 304,3 ± 55,7 n.s.
NT (×10 ⁶)	602 ± 89 71 n.s.	555 ± 78 520 ± 69 n.s.	619 ± 98 485 ± 64 p < 0,02	488 ± 68 516 ± 51 n.s.	532 ± 64 531 ± 97 n.s.

4. Aferências Corticais Cerebelosas

4.1. Terminais das Fibras Trepadoras

4.1.1. Observações qualitativas

Os perfis dos terminais das fibras trepadoras eram facilmente identificáveis à volta dos grandes troncos dendríticos das células de Purkinje. Com efeito, caracterizam-se pelo grande número das suas vesículas sinápticas imersas numa matriz filamentosa densa, pela abundância dos microtúbulos e ainda por estabelecerem contactos sinápticos com espinhas globosas, quase sésseis, igualmente com matriz densa, pertencentes aos dendritos primários e secundários das células de Purkinje (168).

Após 12 meses de alcoolização, era frequente observarem-se essas espinhas com o espessamento pós-sináptico habitual mas desprovidas da normal conexão com o componente pré-sináptico (espinhas deaferenciadas). Apenas se relacionavam com extensos prolongamentos gliais contendo por vezes abundante quantidade de glicogénio (Fig. 2). Notava-se, igualmente, aumento apreciável do número de perfis de terminais de fibras trepadoras, particularmente junto dos topos dos dendritos seccionados obliquamente, o que provavelmente está relacionado com o seu trajecto espiralado. Muitos destes terminais apresentavam uma matriz ainda mais densa do que a habitual, estavam repletos de vesículas sinápticas e com maior número de microtúbulos do que nos respectivos animais testemunha (Fig. 3).

Acresce a circunstância de nos animais alcoolizados durante 12 e 18 meses serem mais frequentes os perfis de terminais com características dos das fibras trepadoras, localizados no neurópilo do 1/3 superficial da camada molecular (Fig. 4). Surgiam envolvidos por bainhas gliais de pequenas dimensões e estabeleciam contactos sinápticos com perfis que, atendendo às suas características morfológicas (Fig. 4), se identificavam como espinhas dendríticas dos ramos periféricos das células de Purkinje.

4.1.2. *Estudo quantitativo*

Os resultados obtidos no estudo morfométrico dos terminais das fibras trepadoras encontram-se resumidos no Quadro 7.

A determinação da densidade volumétrica (V_v) destes terminais não mostrou diferenças significativas entre os grupos alcoolizados e respectivos controlos ao fim de 1, 3 e 6 meses. Pelo contrário, após 12 meses de alcoolização, verificou-se aumento significativo da densidade volumétrica dos terminais das fibras trepadoras, ainda mais acentuado aos 18 meses.

4.2. *Terminais das Fibras Musgosas*

4.2.1. *Observações qualitativas*

Os aspectos morfológicos dos terminais das fibras musgosas dos animais alcoolizados e dos animais de controlo eram idênticos aos descritos por outros autores (72, 168): perfis dispersos no neurópilo da camada granular, frequentemente de grandes dimensões, de contornos irregulares, contendo mitocôndrias e abundantes vesículas sinápticas (Fig. 5). O número destas últimas e a densidade da matriz, levam a pensar que alguns perfis sejam de terminais de fibras trepadoras, originados em plena camada granular, facto referido já por Chan-Palay e Palay (42) no córtex do cerebelo do Rato normal. Qualquer que seja a sua natureza, formam o núcleo de um arranjo sináptico peculiar — o glomérulo cerebeloso (Fig. 5) — onde estabelecem numerosos contactos sinápticos com as ramificações dendríticas das células granulares (Fig. 5). Nos animais alcoolizados, porém, para além destas sinapses, encontraram-se numerosos contactos com os dendritos das células de Golgi.

Após 12 e 18 meses de alcoolização, evidenciaram-se, com relativa frequência, no 1/3 profundo da camada molecular, perfis de terminais com características morfológicas muito semelhantes às das fibras musgosas (Fig. 6): apresen-

QUADRO 7

Densidade Volumétrica (V_v) dos Terminais das Fibras Trepadoras e Musgosas do Córtex Cerebeloso

	1 MES T A (6)		3 MESES T A		6 MESES T A		12 MESES T A		18 MESES T A	
Fibras trepadoras V _v (%)	5,0 ± 2,8	4,2 ± 0,5 n.s.	4,5 ± 2,1	4,1 ± 1,8 n.s.	4,8 ± 1,4	4,0 ± 1,0 n.s.	3,0 ± 1,2	5,5 ± 1,9 p<0,05	4,3 ± 0,6	6,9 ± 1,4 p<0,01
Fibras musgosas V _v (%)	24,1 ± 1,7	22,5 ± * 2,3 n.s.	23,1 ± 2,5	21,3 ± 3,5 n.s.	25,1 ± 3,1	22,7 ± 3,1 n.s.	21,1 ± 1,8	22,8 ± 3,4 n.s.	25,0 ± 4,0	28,7 ± 5,7 n.s.

* Resultados comparados com o teste «t» de Student.

tavam grande superfície, contorno elíptico ou circular e estavam repletos de vesículas sinápticas imersas numa matriz muito densa (Fig. 6). Nestes terminais nunca se observaram contactos sinápticos.

4.2.2. *Estudo quantitativo*

Os resultados obtidos no estudo morfométrico dos terminais das fibras musgosas encontram-se resumidos no Quadro 7. A percentagem do volume do glomérulo cerebeloso ocupado por estes terminais não diferia significativamente, nos grupos de animais alcoolizados e nos grupos testemunha, nos diferentes períodos da experiência.

5. **Células Granulares**

5.1. *Observações qualitativas*

5.1.1. *Microscopia de luz*

Em cortes semifinos, a camada granular dos animais submetidos a períodos de alcoolização de 6, 12 e 18 meses apresentava muitas áreas com evidente redução do número de perfis de células granulares (Fig. 7), ao contrário do verificado nos respectivos animais de controlo. O facto parecia acentuar-se com o tempo de alcoolização.

Após 6 meses de experiência, observaram-se áreas onde os processos degenerativos apresentavam características do tipo granulo-vacuolar (Fig. 8). Eram constituídos por depósitos de tipo lipídico que aumentavam em número e em complexidade com o decorrer do tempo de experiência. Todavia, foi possível observar estruturas idênticas, ainda que menos complexas, num dos animais de 20 meses de idade (controlo de 18 meses de alcoolização).

Com o método de Golgi e em todos os grupos estudados, não se encontraram alterações evidentes da disposição da arborização dendrítica e dos axónios das células granulares.

5.1.2. *Microscopia electrónica*

Após 6 meses de alcoolização, viam-se dispersos na camada granular, numerosos perfis de células granulares com sinais de degenerescência do tipo denso: aumento da densidade do citoplasma, aglomeração e dismorfia dos seus organelos, numerosos corpos multivesiculares, condensação da cromatina nuclear (Fig. 9); por vezes observava-se cariorrexis. As células degeneradas apresentavam a rodeá-las prolongamentos gliais bem desenvolvidos (Fig. 9), sendo frequente observarem-se também perfis dendríticos degenerados nas suas proximidades (Figs. 9 e 10). Estes últimos já eram visíveis, dispersos na camada granular, após 3 meses de consumo de álcool.

Nos animais com mais de 6 meses de alcoolização, havia grande número de células com citoplasma repleto de estruturas semelhantes a gotículas lipídicas e lisosomas.

5.2. *Estudo Quantitativo — Método de Golgi*

5.2.1. *Número de ramificações terminais dos dendritos das células granulares*

Verificou-se, ao fim de 1 mês de experiência, diminuição (ainda que não estatisticamente significativa) do número médio de ramificações digitiformes dos dendritos das células granulares (alcoolizados: $8,51 \pm 0,31$; controlos: $10,20 \pm 1,93$). Após 3 meses de alcoolização, a redução do número de ramificações digitiformes tornava-se significativa ($p < 0,05$) nos animais alcoolizados ($7,52 \pm 0,98$; $10,18 \pm 1,76$). Após 6 meses de alcoolização, não se encontraram diferenças significativas entre os grupos alcoolizados e os controlos ($9,15 \pm 0,96$; $12,71 \pm 3,52$; $7,76 \pm 0,55$ respectivamente aos 6, 12 e 18 meses de alcoolização e $9,41 \pm 0,58$; $10,30 \pm 1,32$; $8,66 \pm 1,36$ nos controlos).

5.2.2. *Densidade de ramificação dendrítica*

Os resultados obtidos no estudo da ramificação dendrítica feito com o método dos círculos concêntricos (223) encontram-se no Quadro 8.

A sua análise mostra o empobrecimento da árvore dendrítica das células granulares nos animais submetidos a 1 e 3 meses de alcoolização, enquanto aos 6, 12 e 18 meses, já não se encontram diferenças entre os grupos alcoolizados e os grupos de controlo.

5.2.3. *Número de varicosidades por unidade de comprimento do axónio das células granulares*

Os resultados obtidos no estudo do número de varicosidades do axónio das células granulares encontram-se no Quadro 9. Saliente-se que os referentes ao número de varicosidades por unidade de comprimento do segmento transversal do axónio das células granulares (fibras paralelas) foram obtidos apenas numa extensão de 30-35 μm , a partir do ponto de bifurcação do axónio. Tal facto fica a dever-se a dificuldades de impregnação destas fibras.

Não se encontraram diferenças significativas do número de varicosidades nos seus segmentos ascendentes entre os grupos alcoolizados e respectivos controlos. No segmento transversal, porém, observou-se aumento significativo do número de varicosidades aos 6 meses de alcoolização.

6. **Organização Estrutural do Neurópilo da Camada Granular (Glómérulo Cerebeloso)**

6.1. *Observações Qualitativas*

A organização do neurópilo da camada granular, nomeadamente a dos glómérulos cerebelosos, mantinha-se idêntica nos grupos de controlo e nos submetidos a 1 e 3 meses de alcoolização.

QUADRO 8

Análise da Ramificação Dendrítica das Células Granulares (Método de Sholl) *

	1 MES		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
1** (10)***	3,6 ± 0,3	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,5	3,7 ± 0,4	3,9 ± 0,3	3,7 ± 0,3	4,0 ± 0,4	4,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3	3,9 ± 0,3
2 (15)	4,2 ± 0,2	4,1 ± 0,3	4,5 ± 0,7	4,1 ± 0,3	4,6 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,1 ± 0,4	4,3 ± 0,8	3,7 ± 0,2	4,2 ± 0,3
3 (20)	4,1 ± 0,8	4,0 ± 0,5	4,6 ± 0,5	3,8 ± 0,5	4,3 ± 0,7	4,1 ± 0,9	3,1 ± 0,3	3,6 ± 0,6	3,5 ± 0,5	3,2 ± 0,9
4 (25)	3,4 ± 1,2	2,9 ± 0,8	3,6 ± 0,8	2,3 ± 0,6	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,9	1,9 ± 0,6	2,0 ± 0,5	2,4 ± 0,8	1,9 ± 1,2
5 (30)	2,2 ± 1,1	1,6 ± 0,5	2,2 ± 1,0	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,6	1,1 ± 0,7	1,5 ± 0,7	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,7	1,1 ± 0,8
6 (35)	1,4 ± 1,0	0,6 ± 0,2	1,2 ± 1,0	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,5	0,6 ± 0,5	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,4
7 (40)	0,8 ± 0,7	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,4
>45 μm	0,46 ± 0,43	0,08 ± 0,08	0,12 ± 0,14	0,04 ± 0,06	0,06 ± 0,06	0,09 ± 0,16	0,04 ± 0,04	0,09 ± 0,07	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,21

* Os resultados indicam o número médio de interseções dos ramos dendríticos com cada círculo. Só estão assinaladas as diferenças significativas.

** Número do círculo.

*** () — Distância do círculo ao corpo celular (μm).

QUADRO 9

Número de Varicosidades dos Segmentos Ascendente e Transversal (Fibras Paralelas)
dos Axônios das Células Granulares do Córtex Cerebeloso

	1 MÊS		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
Segmento ascendente (n.º/100 μm)	10,6 \pm 1,3	12,2 \pm 3,1	12,1 \pm 2,4	10,6 \pm 3,1	8,0 \pm 3,5	11,6 \pm 3,3	8,1 \pm 3,1	11,5 \pm 6,1	10,3 \pm 3,2	12,2 \pm 3,5
	n.s.		n.s.		p < 0,05		n.s.		n.s.	
Segmento transversal (n.º/100 μm)	10,2 \pm 5,3	12,9 \pm 3,1	15,1 \pm 5,1	13,8 \pm 2,5	9,3 \pm 1,8	14,8 \pm 3,0	12,1 \pm 3,4	12,2 \pm 3,8	14,2 \pm 3,6	13,7 \pm 3,1
	n.s.		n.s.		p < 0,02		n.s.		n.s.	

Com efeito, os glomérulos cerebelosos apresentam como elemento central os terminais das fibras musgosas. Estes, de grandes dimensões, repletos de vesículas de tipo redondo, estabelecem múltiplos contactos sinápticos com as ramificações mais distais dos dendritos das células granulares (Fig. 5), que constituem o seu alvo pós-sináptico (72, 97, 168). Formam, também, sinapses com os mesmos dendritos, os terminais nervosos das células de Golgi, de muito menores dimensões, com vesículas do tipo achatado, e localizados à periferia dos glomérulos. Nestes, para além dos dendritos das células granulares, encontram-se os das células de Golgi (Fig. 5), de maiores dimensões e geralmente mais próximos da bainha glial, estrutura que forma o envólucro desta peculiar área do neurópilo da camada granular.

Após 6 meses de alcoolização, observaram-se profundas modificações na organização morfológica dos glomérulos. A mais evidente era a presença de numerosos perfis dendríticos de células granulares com sinais de degenerescência de tipo denso (Fig. 10): matriz com grande densidade e mitocôndrias com estrutura alterada. Apesar disto, os contactos sinápticos estabelecidos entre as fibras musgosas e estes dendritos permaneciam identificáveis, na maior parte das vezes. As bainhas gliais dos glomérulos com alterações degenerativas marcadas eram, regra geral, mais extensas do que as observadas em condições normais. Como consequência da degenerescência dos dendritos das células granulares, os glomérulos cerebelosos tornavam-se, aos 12 e 18 meses de alcoolização, menos complexos, dir-se-ia que empobrecidos (Fig. 11).

Junto destes glomérulos encontravam-se, nos animais alcoolizados, outros de textura muito diversa, onde avultavam profundas modificações no tipo de conexões entre os diferentes componentes glomerulares: a preencher o espaço ocupado, em condições normais, pelos dendritos das células granulares observavam-se perfis dendríticos de células de Golgi (Figs. 12, 13 e 14) de grandes dimensões, com evaginações da membrana para o interior das fibras musgosas (Fig. 12), e com múltiplos contactos sinápticos assimétricos com os terminais dessas fibras (Figs. 12, 13 e 14). Muitos

dos referidos contactos apresentavam as características morfológicas das sinapses chamadas «en marron» (43, 168) (Figs. 13 e 14): contactos múltiplos e alongados, com áreas pós-sinápticas desprovidas de organelos e com espessamentos filamentosos exuberantes, estendendo-se muito para além das zonas activas. Este tipo de sinapse foi descrito em condições normais por Chan-Palay (43) entre os terminais das fibras musgosas e os somas das células de Golgi. No caso presente, mesmo usando cortes seriados, nunca se identificaram perfis de corpos celulares de células de Golgi como elementos pós-sinápticos, mas apenas os seus dendritos (Figs. 13 e 14).

Por último, registe-se não se terem observado alterações morfológicas nos terminais nervosos das células de Golgi dos animais alcoolizados.

6.2. *Estudo Quantitativo*

Os resultados obtidos no estudo morfométrico dos componentes dos glomérulos cerebelosos estão resumidos nos Quadros 7 e 10 e, no Quadro 11, os referentes ao estudo quantitativo das sinapses dos glomérulos.

Como já foi referido não se encontraram diferenças significativas na percentagem do volume do glomérulo ocupado pelos terminais das fibras musgosas (V_v TFM) ao longo de toda a experiência (Quadro 7).

Nos grupos alcoolizados durante 1 e 3 meses e nos respectivos grupos de controlo, não se encontraram diferenças significativas nas densidades volumétricas dos dendritos das células granulares (V_v DCGr), dos terminais nervosos das células de Golgi (V_v TCGo) e dos prolongamentos gliais (V_v Gl) (Quadro 10).

Já após 6 meses de alcoolização, havia redução significativa da densidade volumétrica dos dendritos das células granulares (V_v DCGr), que se acentuava com o tempo de alcoolização (Quadro 10). Esta redução acompanhava-se de diminuição do número destes perfis por unidade de superfície das secções glomerulares (N_A); aos 6 meses de expe-

riência o número destes perfis nos animais testemunha era de $55,1 \pm 8,2$ por $100 \mu\text{m}^2$ de perfil glomerular, enquanto que nos alcoolizados era de $40,3 \pm 6,5$ ($p < 0,02$ «t» Student); aos 12 meses, no grupo testemunha, era de $58,6 \pm 7,0$ e no alcoolizado $33,2 \pm 8,2$ ($p < 0,001$) e aos 18 meses, $56,5 \pm 6,3$ e $37,7 \pm 4,5$ ($p < 0,001$) respectivamente nos controlos e nos animais alcoolizados.

A densidade volumétrica dos terminais nervosos das células de Golgi diminuía significativamente, após 12 meses de alcoolização (Quadro 10). Porém o seu número por $100 \mu\text{m}^2$ de perfil glomerular só se encontrou significativamente reduzido ($p < 0,05$ «t» de Student) no grupo alcoolizado durante 18 meses (controlo: $18,0 \pm 2,6$; alcoolizado: $13,7 \pm 2,8$).

Por seu lado a densidade volumétrica dos prolongamentos gliais estava significativamente aumentada, após 6 meses de alcoolização (Quadro 10).

Pôde verificar-se que os valores encontrados para estes diferentes parâmetros não estavam dependentes de diferenças das áreas médias dos perfis glomerulares, pois elas não variavam significativamente nos grupos estudados com tempos diferentes de alcoolização.

Não se encontraram, entre os vários grupos alcoolizados e os seus controlos, diferenças significativas no número médio de sinapses contadas por perfil glomerular (Quadro 11). No entanto, a quantificação parcelar dos diferentes tipos de sinapses do glomérulo mostrou diminuição significativa do número de contactos sinápticos estabelecidos entre os terminais das fibras musgosas e os dendritos das células granulares nos grupos alcoolizados a partir dos 6 meses de experiência (Quadro 11) e, pelo contrário, aumento do número de contactos entre os mesmos terminais e os dendritos das células de Golgi após 12 meses de alcoolização (Quadro 11). O número de sinapses entre os terminais nervosos das células de Golgi e os dendritos das células granulares não apresentava diferenças significativas (Quadro 11).

QUADRO 10

Estudo Morfométrico dos Glomérulos Cerebelosos

	1 MES T A (6)		3 MESES T A		6 MESES T A		12 MESES T A		18 MESES T A	
Dendritos das células granulares (DCGr) V (%)	17,9 ± 1,4	19,7 ± 2,6	20,0 ± 3,6	16,2 ± 2,3	19,1 ± 2,0	12,5 ± 3,9	18,6 ± 2,0	12,6 ± 1,9	20,1 ± 4,0	10,9 ± 0,7
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,02	p<0,02	p<0,0005	p<0,0005	p<0,0001	p<0,0001
Terminais das células de Golgi (TOGO) V (%)	16,1 ± 1,2	17,4 ± 1,1	17,9 ± 2,0	17,1 ± 3,0	16,0 ± 2,9	14,7 ± 1,8	16,9 ± 2,5	11,9 ± 2,4	15,6 ± 1,9	11,4 ± 1,7
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,02	p<0,02	p<0,01	p<0,01
Prolongamentos gliais (GI) V (%)	15,8 ± 2,8	17,4 ± 1,4	17,9 ± 3,9	26,3 ± 7,1	16,5 ± 3,1	28,2 ± 7,9	17,1 ± 3,0	29,6 ± 3,3	17,1 ± 2,8	27,2 ± 2,8
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,02	p<0,02	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

Resultados comparados com o teste «t» de Student.

QUADRO II

Estudo Quantitativo das Sinapses dos Glomérulos Cerebelosos

	1 MES T A (6)		3 MESES T A		6 MESES T A		12 MESES T A		18 MESES T A	
Número médio de sinapses por perfil glomerular	12,6 ± 3,2	13,9 ± 3,0	11,9 ± 2,6	13,3 ± 3,2	12,5 ± 1,9	10,2 ± 3,9	13,0 ± 3,8	10,4 ± 2,5	10,4 ± 1,8	11,4 ± 2,9
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Número médio de sinapses TFM ^{a)} -DCGr por perfil glomerular	10,1 ± 2,1	10,9 ± 3,0	9,2 ± 1,9	10,5 ± 2,7	9,8 ± 1,6	6,2 ± 1,9	10,5 ± 2,4	6,1 ± 0,8	8,3 ± 1,0	5,2 ± 1,3
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,02	p<0,02	p<0,01	p<0,01	p<0,005	p<0,005
Número médio de sinapses TFM-DCGo ^{c)} por perfil glomerular	1,0 ± 0,6	1,2 ± 0,9	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,8	2,2 ± 1,8	0,9 ± 0,6	4,2 ± 2,3	1,0 ± 0,6	3,6 ± 1,7
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,02	p<0,02	p<0,02	p<0,02
Número médio de sinapses TCGo ^{d)} -DCGr por perfil glomerular	1,5 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,6	1,6 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,9 ± 1,0	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,8	1,5 ± 0,7
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

a) TFM — Terminal da fibra musgosa; b) DCGr — Dendrito da célula granular; c) DCGo — Dendrito da célula de Golgi; d) TCGo — Terminal da célula de Golgi.

Resultados comparados com o teste «t» de Student.

7. Árvores Dendríticas das Células de Purkinje

7.1. Observações Qualitativas

As árvores dendríticas das células de Purkinje dos animais dos grupos testemunha apresentavam aspecto normal (72, 168, 194), espraiando-se no plano perpendicular ao maior eixo das folhas cerebelosas e ramificando-se de modo quase sempre dicotômico, a partir de um dendrito primário (Fig. 15 A, B). Com exceção dos grandes troncos dendríticos que apresentam pequena densidade de espinhas, os restantes ramos apresentam-nas em grande número (Fig. 16), particularmente nas ramificações mais periféricas.

A partir dos 6 meses de alcoolização, era evidente uma redução global da área ocupada pelas arborizações dendríticas de algumas destas células (Fig. 17 A, B), bem como o empobrecimento das suas ramificações. Paralelamente, notava-se marcada diminuição do número das espinhas (Fig. 18), que se acentuava com o decurso da alcoolização. Ao contrário do observado nos grupos de controlo, nos quais as espinhas dendríticas se encontravam uniformemente distribuídas, nos animais alcoolizados observavam-se grandes extensões de ramos dendríticos desnudados. A redução do número de espinhas era mais marcada nos ramos periféricos da parte apical da arborização.

Algumas árvores dendríticas tinham orientação espacial diferente da usual, deixando de apresentar-se espalmadas num plano perpendicular ao eixo das folhas. Pelo contrário, os seus dendritos apresentavam variações bruscas de orientação (Fig. 19 A, B). A perda assinalada de espinhas dendríticas era mais evidente nas árvores em que a disposição dos dendritos era diferente da usual (Fig. 20).

Após 6 meses de alcoolização era frequente observarem-se nos ramos dendríticos periféricos, espinhas com características morfológicas diferentes das normais: mais longas, mais finas e distribuídas irregularmente.

É de realçar que as células com as alterações dendríticas descritas encontravam-se junto de outras, de morfologia preservada. No entanto, o número de células com alterações aumentava marcadamente com o decorrer da experiência.

7.2. *Estudo Quantitativo*

Os resultados quantitativos obtidos no estudo das árvores dendríticas das células de Purkinje impregnadas pelo método de Golgi, encontram-se resumidos nos Quadros 12 e 13 e representados graficamente na Fig. 22.

7.2.1. *Area dendrítica*

Nos grupos de animais submetidos a alcoolização, a área dendrítica era significativamente menor do que a dos respectivos grupos de controlo, após 6 meses de alcoolização (Quadro 12). Esta redução acentuava-se com o tempo de experiência (Quadro 12), chegando aos 32% e 40% nos animais submetidos a alcoolização durante 12 e 18 meses respectivamente.

7.2.2. *Densidade de ramificação dendrítica*

Não se encontraram alterações nos grupos submetidos a alcoolização por períodos de 1, 3 e 6 meses quando comparados com os respectivos grupos de controlo. Porém, aos 12 e 18 meses, a redução da densidade de ramificação dendrítica era já significativa nos grupos alcoolizados.

7.2.3. *Comprimento dendrítico total*

Verificou-se redução significativa do comprimento dendrítico total já aos 3 meses de administração de álcool (Quadro 12) e a sua acentuação com o tempo de experiência.

QUADRO 12

Estudo Quantitativo das Árvores Dendríticas das Células de Purkinje do Córtex Cerebeloso

	1 MESES		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
Área dendrítica (μm^2)	43646 ± 4923	36572 ± 4346	43805 ± 4594	35625 ± 6054	42887 ± 5700	29244 ± 3529	42456 ± 6423	29456 ± 2679	43170 ± 6418	25639 ± 3511
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,005	p < 0,005	p < 0,005	p < 0,005	p < 0,001	p < 0,001
Densidade de ramificação dendrítica ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	0,187 ± 0,029	0,197 ± 0,017	0,199 ± 0,034	0,191 ± 0,026	0,193 ± 0,025	0,173 ± 0,023	0,208 ± 0,024	0,163 ± 0,028	0,209 ± 0,031	0,156 ± 0,018
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,02	p < 0,02
Comprimento dendrítico total (μm)	8175 ± 922	7190 ± 835	8713 ± 914	6804 ± 1063	8277 ± 1100	5059 ± 907	8831 ± 1236	4766 ± 437	9044 ± 1245	3992 ± 548
	n.s.	n.s.	p < 0,05	p < 0,001						
N.º de espinhas dendríticas (n.º/10 μm)	10,0 ± 0,8	10,0 ± 1,1	9,3 ± 0,7	9,2 ± 1,2	10,3 ± 0,9	8,8 ± 1,3	10,3 ± 0,6	8,0 ± 0,5	10,1 ± 0,6	7,9 ± 0,6
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Resultados comparados com o teste «t» de Student.

* p ≤ 0,05 com teste «U» de Mann-Whitney.

QUADRO 13

Número Total de Ramos Dendríticos das Células de Purkinje do Córtex Cerebeloso

	1 MES T A (6)	3 MESES T A	6 MESES T A	12 MESES T A	18 MESES T A
Número total de ramos dendríticos	438 ± 47 n.s.	412 ± 78 n.s.	489 ± 64 p < 0,005	493 ± 51 p < 0,001	405 ± 27 p < 0,001
	384 ± 63 n.s.	347 ± 55 n.s.	290 ± 75 p < 0,005	289 ± 45 p < 0,001	218 ± 59 p < 0,001

Resultados comparados com o teste «t» de Student.

7.2.4. *Número de ramos dendríticos*

O número total de ramos dendríticos das células de Purkinje em cada grupo, avaliado após a sua ordenação somatopetal (Fig. 21), era significativamente menor, após 6 meses de administração de álcool (Quadro 13), em consequência da perda de ramos de primeira e segunda ordem (Figs. 21 e 22). Enquanto que nos grupos de controlo era frequente o ramo dendrítico primário ter o número de ordem 6 (Figs. 21 e 22), isso só muito raramente acontecia nos animais submetidos a alcoolização para além dos 12 meses.

7.2.5. *Número de espinhas dendríticas*

Nos grupos de animais submetidos a alcoolização havia diminuição marcada do número de espinhas dendríticas, após 6 meses de experiência, quando comparados com os respectivos grupos de controlo (Quadro 12), que se acentuava com o tempo de alcoolização.

8. **Árvores Dendríticas dos Interneurónios** — **Células de Golgi, Células em Cesto** **e Células Estreladas**

A observação qualitativa, após impregnação pela prata, das árvores dendríticas das células de Golgi e das células estreladas do 1/3 superficial da camada molecular não mostrou alterações apreciáveis. Identificaram-se nestas células, os diversos subtipos neuronais e padrões de ramificação dendrítica já descritos (44, 168, 191). Pelo contrário, as células em cesto apresentavam, nos animais alcoolizados durante 18 meses, empobrecimento da ramificação dendrítica quando comparadas com as dos respectivos animais testemunha.

Não foi possível, no material disponível, o estudo quantitativo das células de Golgi que permitisse a avaliação precisa de possíveis alterações da sua arborização dendrítica,

por não se ter conseguido número suficiente de células com as suas árvores dendríticas completamente impregnadas. A grande variabilidade de forma e extensão das respectivas arborizações foi outro factor impeditivo.

As células estreladas do 1/3 médio da camada molecular são, do ponto de vista morfológico, elementos muito heterogéneos, de transição entre as células em cesto e as células estreladas do 1/3 superficial da camada molecular (179, 191, 194). Não se procedeu, por isso, à análise quantitativa das suas arborizações dendríticas e qualitativamente não se vislumbraram alterações.

Analisadas com o método de Sholl (223), as árvores dendríticas das células em cesto apresentavam, após 6 meses de consumo de álcool, redução percentual do número de intersecções dos respectivos ramos, sem que, contudo, se tivessem encontrado diferenças significativas, entre os animais alcoolizados e os respectivos animais testemunha. Só se tornaram significativas aos 18 meses de alcoolização (Quadro 14).

As células estreladas do 1/3 superficial da camada molecular não apresentavam alterações significativas da sua ramificação dendrítica, embora houvesse redução percentual do número de intersecções dos ramos dendríticos, mais acentuada aos 18 meses de alcoolização (Quadro 15).

9. Organização Estrutural do Neurópilo da Camada Molecular

9.1. Observações Qualitativas

Após 3 meses de alcoolização, o estudo ultraestrutural do neurópilo da camada molecular do córtex cerebeloso mostrava marcados aspectos degenerativos. Eram numerosos os prolongamentos celulares distróficos bem como extensas as áreas onde eram visíveis perfis degenerados.

Os perfis distróficos encontravam-se dispersos na camada molecular (Fig. 23), em todos os cortes observados, aumentando de número e complexidade com a duração da

QUADRO 14

Análise da Ramificação Dendrítica das Células em Cesto (Método de Sholl) *

	1 MÊS		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
1**	7,4 ± 1,3	7,5 ± 0,9	7,1 ± 1,6	7,3 ± 1,2	7,1 ± 1,5	6,0 ± 1,1	6,5 ± 1,2	6,3 ± 1,2	6,7 ± 0,6	7,0 ± 0,8
2	7,9 ± 1,0	7,5 ± 2,5	8,1 ± 1,0	8,4 ± 1,1	7,9 ± 1,2	7,6 ± 1,3	7,8 ± 1,2	8,4 ± 1,2	8,0 ± 0,7	8,2 ± 1,2
3	7,7 ± 1,1	7,7 ± 1,3	7,4 ± 1,2	7,5 ± 1,1	7,5 ± 1,1	6,8 ± 1,0	7,6 ± 1,3	8,5 ± 1,0	7,7 ± 1,0	6,9 ± 1,1
4	7,0 ± 1,4	7,0 ± 0,9	7,5 ± 0,5	6,8 ± 1,1	6,5 ± 1,1	5,4 ± 1,2	7,0 ± 1,1	7,4 ± 1,2	7,4 ± 0,5	5,4 ± 0,9
5	6,3 ± 1,4	5,9 ± 1,7	5,3 ± 0,7	5,1 ± 1,5	4,7 ± 2,4	3,5 ± 1,5	5,3 ± 1,7	4,8 ± 1,6	5,8 ± 0,7	4,0 ± 0,8
6	4,6 ± 0,8	4,3 ± 1,8	3,9 ± 1,3	3,6 ± 2,5	3,6 ± 2,5	1,9 ± 1,3	3,0 ± 1,5	3,0 ± 1,3	4,0 ± 0,8	2,3 ± 0,4
7	3,0 ± 1,0	3,2 ± 1,7	2,5 ± 1,1	2,6 ± 1,6	2,2 ± 1,5	1,2 ± 0,5	2,3 ± 1,7	1,7 ± 1,0	2,5 ± 0,6	1,4 ± 0,4
8	1,5 ± 0,5	1,8 ± 1,0	1,8 ± 1,1	1,1 ± 0,9	1,2 ± 1,3	0,9 ± 0,7	1,1 ± 0,9	0,6 ± 0,5	1,2 ± 0,5	0,7 ± 0,4
>9	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,7	0,5 ± 0,7	0,7 ± 1,0	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1

* Os resultados indicam o número médio de intersecções dos ramos dendríticos com cada círculo.

Só estão assinaladas as diferenças significativas.

** Número do círculo ($\mu\text{m} \times 20$).

QUADRO 15

Análise da Ramificação Dendrítica das Células Estreladas do 1/3 Superficial da Camada Molecular (Método de Sholl) *

	1 MÊS		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
1**	6,1 ± 2,0	6,3 ± 2,1	6,1 ± 1,8	6,6 ± 1,5	5,5 ± 1,0	5,6 ± 1,1	5,5 ± 1,4	6,0 ± 1,2	6,6 ± 0,9	6,6 ± 1,4
2	10,2 ± 1,4	10,3 ± 2,0	10,1 ± 1,5	10,5 ± 1,9	9,0 ± 1,3	9,5 ± 1,8	9,6 ± 2,1	9,9 ± 2,7	10,5 ± 1,8	10,2 ± 2,3
3	10,6 ± 1,1	10,6 ± 1,8	10,7 ± 1,4	10,3 ± 1,6	9,8 ± 1,9	9,4 ± 1,7	10,5 ± 2,3	9,9 ± 4,2	11,9 ± 2,5	9,8 ± 1,3
4	10,7 ± 0,8	10,0 ± 2,2	9,1 ± 0,6	9,6 ± 1,1	9,3 ± 0,9	8,3 ± 1,2	10,1 ± 2,5	9,0 ± 1,4	10,0 ± 2,8	6,9 ± 0,6
5	6,1 ± 1,1	6,2 ± 2,6	6,1 ± 1,2	6,3 ± 1,3	5,7 ± 1,2	5,8 ± 2,0	6,1 ± 2,6	5,6 ± 2,3	4,8 ± 1,5	3,5 ± 1,2
6	3,7 ± 1,3	3,6 ± 1,4	3,3 ± 1,0	3,3 ± 1,6	3,3 ± 1,3	3,2 ± 2,4	3,6 ± 1,9	3,0 ± 1,8	2,8 ± 0,7	2,0 ± 0,9
7	1,8 ± 0,6	1,6 ± 0,9	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,8	1,8 ± 1,4	1,7 ± 1,3	1,0 ± 0,7	1,3 ± 0,4	0,7 ± 0,6
>8	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,6	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,6	0,2 ± 0,3

* Os resultados indicam o número médio de interseções dos ramos dendríticos com cada círculo.

Nenhuma diferença é significativa.

** Número do círculo ($\mu\text{mx}10$).

alcoholização. Após os 6 meses de experiência, visualizavam-se, no 1/3 profundo da camada molecular, placas neuríticas do tipo primitivo (254, 288, 292) (Fig. 24), constituídas por agregados desses perfis onde se reconheciam numerosos corpos densos e lamelares, grânulos de lipofuscina e figuras tubulo-vesiculares (Fig. 24). Muitas destas estruturas em degenerescência puderam ser identificadas como botões de fibras paralelas, dada a preservação dos contactos sinápticos que estabeleciam com as espinhas das células de Purkinje (Fig. 25). Nunca se vislumbraram depósitos de substância amilóide nestes agregados, se bem que nalguns casos tenha sido observado, disperso no neurópilo, material filamentososo com as suas características (Fig. 24). O número e a área das placas neuríticas assim constituídas, aumentava com o decorrer do tempo de alcoholização, sendo frequente atingirem os 20-25 μ m de diâmetro ao fim de 12 meses.

O neurópilo bordejante não apresentava alterações. Também não se observaram células microgliais descritas em placas deste tipo por outros autores em situações diversas (288, 290, 291), embora fosse frequente a presença de reacção glial à periferia.

Mais abundantes, ainda, eram os aspectos degenerativos de tipo denso. Atingiam indiscriminadamente dendritos e axónios, englobando os componentes pré e pós-sinápticos dos contactos estabelecidos entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje.

Quando degenerados, os ramos dendríticos mais periféricos das células de Purkinje e as suas espinhas, apresentavam uma matriz muito densa com aglomeração das mitocôndrias (Figs. 26 e 27) e eram, muitas vezes, envolvidos por extensos prolongamentos gliais (Fig. 26). Quanto às sinapses estabelecidas com os terminais das fibras paralelas, permaneciam muitas vezes sem alterações morfológicas (Figs. 26 e 27), à semelhança do que foi descrito noutras situações em que havia degenerescência dendrítica (17, 175, 176).

Simultaneamente, observava-se degenerescência marcada desses próprios terminais (Fig. 28). Tal como acontecia com os dendritos, também estes perfis apresentavam matriz muito densa, com as vesículas sinápticas aglomeradas no seu inte-

rior. Em fases mais adiantadas do processo degenerativo era comum verem-se estes terminais com contornos irregulares e conteúdo de tal modo densificado que tornava difícil a identificação das vesículas sinápticas e das mitocôndrias. Nestes casos, os terminais degenerados apareciam envolvidos por processos gliais muito exuberantes, que os isolavam dos seus componentes pós-sinápticos (Fig. 28). Apareciam dispersos na camada molecular, havendo zonas onde se encontravam com maior abundância, provavelmente correspondendo àquelas em que a degenerescência das células granulares, atrás mencionada, era mais evidente.

Após 6 meses de alcoolização, a par dos perfis degenerados observavam-se terminais de fibras paralelas e espinhas dendríticas das células de Purkinje com características diferentes das usuais. Encontravam-se dispersos no neurópilo, terminais de fibras paralelas com densidades pré-sinápticas em relação com prolongamentos gliais. Não se visualizava o correspondente componente pós-sináptico (Figs. 29 e 31). Inversamente, e muitas das vezes, na sua proximidade, identificavam-se perfis de espinhas dendríticas de células de Purkinje onde se mantinha visível o espessamento pós-sináptico (Figs. 28, 30 e 31) sem a presença do componente pré-sináptico, substituído por prolongamentos gliais (espinhas deafe-renciadas) (Figs. 28, 30 e 31).

A par destes fenómenos degenerativos e dos aspectos morfológicos inusuais de terminais e espinhas descritos, visualizavam-se, na camada molecular dos animais submetidos a 6 meses de alcoolização ou mais, alterações tradutoras de actividade reorganizativa do neurópilo, centrada nas sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas das células de Purkinje e ainda entre as fibras paralelas e os dendritos dos inter-neurónios.

Nestas circunstâncias as células de Purkinje apresentavam nos seus ramos periféricos dois tipos de espinhas morfológicamente diferentes; umas com características normais: colo curto, cabeça arredondada, dimensões não superiores a 1 μm (72, 168, 194); outras, já referidas ao descrever o material impregnado pelo método de Golgi (Figs. 32 e 33) eram de maiores dimensões (2-3 μm), de colo fino e muito

longo, onde se viam elementos de retículo endoplasmático liso (Fig. 34) e contendo, com frequência, na sua base, vesículas revestidas e microtúbulos. Estas espinhas alongadas formavam contactos sinápticos com terminais de fibras paralelas (Fig. 34), possuidores de densidades pós-sinápticas muito acentuadas. Eram também frequentes os perfis dendríticos com as características dos «cones» de crescimento (184, 296), partindo de troncos de maior calibre. Com estas estruturas estabeleciam sinapses os terminais de fibras paralelas (Fig. 35).

Encontravam-se ainda outros fenómenos de carácter regenerativo. Assim, na camada molecular dos animais submetidos a alcoolização durante 6 meses ou mais, eram muito numerosos os terminais nervosos de fibras paralelas com dimensões superiores ao habitual e de conteúdo vesicular extremamente elevado (Fig. 35) e muitas das vezes rodeados por extensos prolongamentos gliais (Fig. 36). O mesmo terminal estabelecia contactos sinápticos com várias espinhas dendríticas de células de Purkinje e até com pequenos dendritos de interneurónios (Fig. 36).

Era grande, nestes animais, o número de troncos dendríticos de interneurónios revestidos de sinapses com terminais de fibras paralelas frequentemente dos do tipo atrás descrito (Figs. 37, 38 e 39). Pelo contrário, não se observaram alterações nos contactos sinápticos entre os terminais das fibras paralelas e os dendritos das células de Purkinje.

Eram frequentes, também, os arranjos sinápticos formados por um terminal de uma fibra paralela, usualmente dos de maior dimensão, com múltiplas espinhas de células de Purkinje, o que lhes conferia um aspecto típico em roseta, já descrito noutras circunstâncias experimentais (46, 234) (Fig. 40).

Para além destes contactos sinápticos múltiplos, observaram-se terminais de fibras paralelas, dos de grandes dimensões, envolvendo completamente a cabeça de espinhas dendríticas, formando assim sinapses com extensão superior à normal (Fig. 41), sem que para tal contribuísse o aumento do tamanho da cabeça dessas espinhas.

Por último, e ainda em relação às sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje, encontraram-se com frequência, após 12 meses de alcoolização, mais do que um contacto sináptico sobre a extremidade distal das espinhas e estabelecidos com terminais de mais do que uma dessas fibras (Fig. 42).

9.2. *Estudo Quantitativo*

Passa a expôr-se os dados mais importantes encontrados na análise quantitativa do neurópilo da camada molecular.

a) Os resultados obtidos no estudo quantitativo das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje dos grupos de animais alcoolizados e respectivos grupos testemunha estão resumidos nos Quadros 16, 17 e 18.

Pode verificar-se que a densidade numérica destas sinapses se encontrava significativamente reduzida a partir dos 6 meses de alcoolização e que o número total destes contactos sinápticos, obtido pela multiplicação da densidade numérica das sinapses pelo volume correspondente a 2/3 da camada molecular, se mostrava também significativamente reduzido nos mesmos períodos experimentais (Quadro 16).

Não se encontraram diferenças no ângulo α de curvatura das sinapses após 12 e 18 meses de alcoolização (aos 12 meses era de $26,7 \pm 20,1$ e $23,7 \pm 15,3$ graus respectivamente nos grupos de controlo e alcoolizado, enquanto aos 18 meses os valores eram de $25,1 \pm 15,6$ e $23,2 \pm 14,4$ graus).

O diâmetro médio das sinapses encontrava-se significativamente aumentado, após 6 meses de consumo de álcool (Quadro 17). Para avaliar a significância das diferenças observadas nas distribuições dos diâmetros sinápticos aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (51) para 2 amostras: encontraram-se diferenças significativas (nível de 5%), aos 12 e 18 meses de experiência. A área média das sinapses estava significativamente aumentada, após 6 meses de con-

QUADRO 16

Número de Sinapses entre as Fibras Paralelas
e as Espinhas Dendríticas das Células de Purkinje

	1 MESES		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
N [*] V (n.º/µm ³)	0,671 ± 0,137	0,706 ± 0,083	0,721 ± 0,096	0,691 ± 0,082	0,743 ± 0,072	0,621 ± 0,089	0,739 ± 0,067	0,598 ± 0,110	0,995 ± 0,843	0,490 ± 0,078
	n.s.		n.s.		p < 0,05		p < 0,02		p < 0,01	
NT** (X10 ⁶)	6864 ± 1401	7607 ± 891	7268 ± 969	6423 ± 764	7988 ± 771	5361 ± 791	8204 ± 746	4630 ± 854	12402 ± 10500	4536 ± 740
	n.s.		n.s.		p < 0,002		p < 0,002		p < 0,002	

* N_v — Número de sinapses por unidade de volume.

** NT — Número total de sinapses correspondente a 2/3 do volume da camada molecular (por 1/2 cerebello).

QUADRO 17

Diâmetro e Área das Sinapses entre as Fibras Paralelas e as Espinhas Dendríticas das Células de Purkinje

	1 MES T (801)*	A (790)	3 MESES T (822)	A (820)	6 MESES T (853)	A (784)	12 MESES T (827)	A (686)	18 MESES T (820)	A (678)
Diâmetro médio das sinapses (μm)	0,306 \pm 0,110	0,307 \pm 0,108	0,299 \pm 0,101	0,310 \pm 0,108	0,289 \pm 0,116	0,316 \pm 0,034	0,297 \pm 0,109	0,368 \pm 0,133	0,294 \pm 0,036	0,380 \pm 0,132
	(0,129)**		(1,508)		(5,206)		(8,006)		(13,593)	
Área média das sinapses (μm^2)	0,083 \pm 0,073	0,083 \pm 0,072	0,078 \pm 0,054	0,082 \pm 0,064	0,076 \pm 0,062	0,089 \pm 0,070	0,078 \pm 0,062	0,120 \pm 0,094	0,080 \pm 0,072	0,127 \pm 0,107
	(0,019)		(0,971)		(2,812)		(7,311)		(7,096)	

() * — Valor teórico da distribuição.

() ** — Investigaram-se as possíveis significâncias das diferenças entre médias, dividindo estas pela soma dos desvios padrões de ambas as médias (DFM). O critério, por excesso de cautela, foi que este quociente fosse superior a 1,96 (significativo ao nível de 5%).

QUADRO 18

Area Total Média das Sinapses entre as Fibras Paralelas e as Espinhas Dendríticas das Células de Purkinje *

	1 MES		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
Area total média (mm ²)	569,7 ± 116,8	631,4 ± 74,0	566,9 ± 75,6	526,7 ± 62,4	607,1 ± 58,6	477,2 ± 70,4	639,9 ± 58,2	555,6 ± 102,5	992,2 ± 840,0	576,1 ± 94,0
	n.s.		n.s.		p < 0,004		n.s.		n.s.	

* Calculada no volume correspondente a 2/3 da camada molecular.

sumo de álcool (Quadro 17). A subida destes valores, calculados por desdobramento dos perfis das sinapses, não constituiu surpresa, já que os perfis dos espessamentos pós-sinápticos se tinham tornado mais extensos nos grupos submetidos a alcoolização durante 12 e 18 meses (aos 12 meses eram de $0,288 \pm 0,039 \mu\text{m}$ e $0,356 \pm 0,018 \mu\text{m}$ respectivamente nos grupos de animais de controlo e de animais alcoolizados, $p < 0,02$, e aos 18 meses os valores eram de $0,292 \pm 0,025 \mu\text{m}$ e $0,371 \pm 0,024 \mu\text{m}$, $p < 0,002$).

A área total média destas sinapses, em cada grupo, obtida através da multiplicação da respectiva área média por cada um dos valores individuais do número total de sinapses, encontrava-se significativamente reduzida aos 6 meses de alcoolização (Quadro 18). No entanto, e devido ao aumento verificado na área média das sinapses, os valores encontrados nos períodos subsequentes (12 e 18 meses), embora inferiores aos dos verificados nos grupos testemunha, já não eram significativos. Este facto já era previsível antes de se proceder ao desdobramento dos perfis dos discos sinápticos: assim o indicava a análise dos valores obtidos para a densidade de superfície destes contactos (aos 12 meses era de $117,5 \pm 28,4 \mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}^3$ e $150,5 \pm 30,3 \mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}^3$ respectivamente nos grupos de controlo e alcoolizado, sendo significativamente diferente aos 18 meses, $92,2 \pm 22,8 \mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}^3$ e $133,2 \pm 10,7 \mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}^3$ respectivamente nos grupos de controlo e alcoolizado $p < 0,004$).

No que respeita ao diâmetro médio das cabeças das espinhas dendríticas das células de Purkinje, não se verificaram, nos diferentes períodos de experiência, alterações significativas (valor médio nos grupos de controlo, $0,505 \mu\text{m}$ e nos grupos alcoolizados, $0,503 \mu\text{m}$).

b) Os resultados obtidos no estudo quantitativo das sinapses entre as fibras paralelas e os dendritos dos interneurónios estão resumidos nos Quadros 19, 20 e 21.

A análise do Quadro 19 permite verificar que a densidade numérica e o número total destas sinapses, no volume correspondente a 2/3 da camada molecular, se encontravam significativamente aumentados aos 18 meses de consumo de

álcool, confirmando-se assim a impressão recolhida pela análise qualitativa do material.

A extensão dos perfis dos espessamentos pós-sinápticos era significativamente maior aos 6 meses de alcoolização ($0,268 \pm 0,032 \mu\text{m}$, grupo de controlo; $0,321 \pm 0,038 \mu\text{m}$, grupo alcoolizado), o que não se verificava aos 12 e 18 meses.

O diâmetro médio e a área média das sinapses, grandezas calculadas após desdobramento dos seus perfis, apresentavam, quando se comparavam os valores obtidos nos grupos alcoolizados com os encontrados nos correspondentes grupos de controlo, variações de sentido oposto ao longo da experiência (Quadro 20). As diferenças entre as distribuições cumulativas destas sinapses eram significativas (nível de 5%), aos 6 e 12 meses, quando analisadas com o teste de Kolmogorov-Smirnov (51) para 2 amostras.

A área total destas sinapses, calculada de modo idêntico ao já referido em *a*), encontrava-se aumentada, embora não significativamente, aos 18 meses de alcoolização (Quadro 21).

c) A fracção do volume da camada molecular ocupada pelos prolongamentos gliais não mostrava diferenças significativas ao longo da experiência: média dos grupos de controlo 19,8% e dos grupos de animais alcoolizados 18,3%. Pelo contrário, a percentagem do volume da camada molecular ocupada pelos terminais das fibras paralelas encontrava-se aumentada, embora não significativamente, após 12 meses de alcoolização, e de modo significativo aos 18 meses de consumo de álcool (Quadro 22).

10. Axónios das Células de Purkinje

O segmento inicial dos axónios das células de Purkinje, observado em cortes transversais, obtidos na parte mais superficial da camada granular, apresentava as mesmas características nos animais alcoolizados e nos respectivos controlos (Fig. 43).

QUADRO 19

Número de Sinapses entre as Fibras Paralelas e os Dendritos dos Interneurónios

	1 MÊS		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
N _V (n.º/µm ³)	0,077 ± 0,063	0,098 ± 0,054	0,158 ± 0,066	0,152 ± 0,066	0,173 ± 0,085	0,140 ± 0,084	0,101 ± 0,013	0,099 ± 0,032	0,092 ± 0,022	0,174 ± 0,017
	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		p ≤ 0,002	
N _T (×10 ⁶)	1589 ± 1933	1053 ± 586	1591 ± 665	1415 ± 613	1864 ± 910	1222 ± 301	1122 ± 146	769 ± 246	1140 ± 274	1614 ± 156
	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		p ≤ 0,02	

QUADRO 20

Diâmetro e Área das Sinapses entre as Fibras Paralelas
e os Dendritos dos Interneurônios

	1 MÊS		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
	(443)*	(515)	(739)	(739)	(733)	(1012)	(413)	(394)	(490)	(622)
Diâmetro médio das sinapses (μm)	0,307 \pm 0,264 \pm 0,133	0,264 \pm 0,094	0,271 \pm 0,126	0,245 \pm 0,089	0,246 \pm 0,126	0,312 \pm 0,134	0,295 \pm 0,122	0,316 \pm 0,137	0,319 \pm 0,131	0,295 \pm 0,121
	(4,110)**		(3,287)		(7,444)		(1,627)		(2,160)	
Área média das sinapses (μm^2)	0,088 \pm 0,088	0,062 \pm 0,059	0,070 \pm 0,083	0,053 \pm 0,049	0,060 \pm 0,087	0,091 \pm 0,099	0,080 \pm 0,075	0,093 \pm 0,112	0,093 \pm 0,084	0,080 \pm 0,092
	(3,834)		(3,501)		(4,901)		(1,365)		(1,737)	

() * -- Valor teórico da distribuição.

() ** -- Investigaram-se as possíveis significâncias das diferenças entre médias, dividindo estas pela soma dos desvios padrões de ambas as médias (DPM). O critério, por excesso de cautela, foi que este quociente fosse superior a 1,96 (significativo ao nível de 5%).

QUADRO 21

Area Total Média das Sinapses entre as Fibras Paralelas e os Dendritos dos Interneurônios *

	1 MES		3 MESES		6 MESES		12 MESES		18 MESES	
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
Area total média (mm ²)	139,8 ± 170,1	65,3 ± 36,4	111,4 ± 46,6	75,0 ± 32,5	111,8 ± 54,6	111,6 ± 27,4	89,7 ± 11,7	71,5 ± 22,9	106,0 ± 25,5	129,2 ± 12,5
	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.			

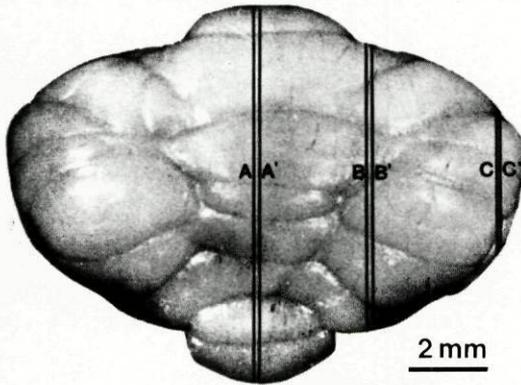
* Calculada no volume correspondente a 2/3 da camada molecular.

QUADRO 22

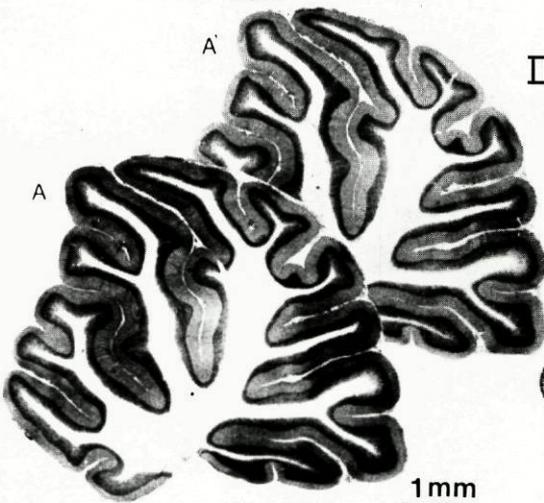
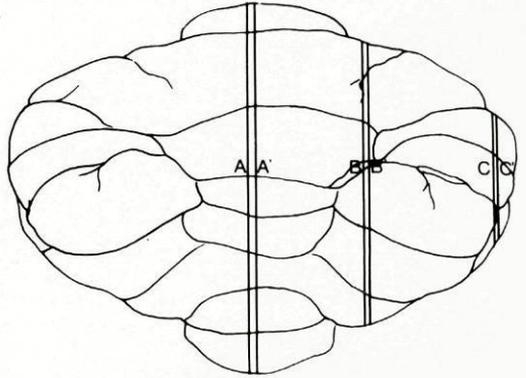
Densidade Volumétrica (V_v) dos Terminais das Fibras Paralelas

	1 MES T A (6)	3 MESES T A	6 MESES T A	12 MESES T A	18 MESES T A
V_v (%)	18,6 ± 18,2 ± 5,1 5,3 n.s.	19,7 ± 20,5 ± 2,7 2,5 n.s.	21,3 ± 24,0 ± 4,9 4,8 n.s.	18,7 ± 25,2 ± 5,7 7,1 n.s.	18,0 ± 25,4 ± 5,7 8,9 p < 0,05

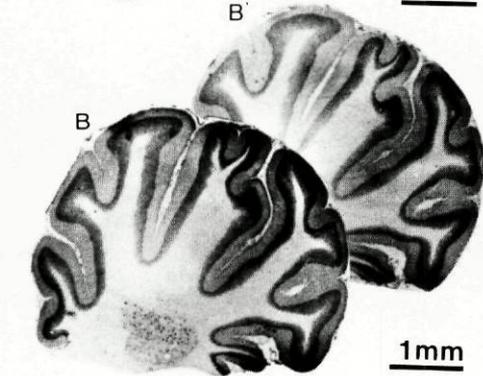
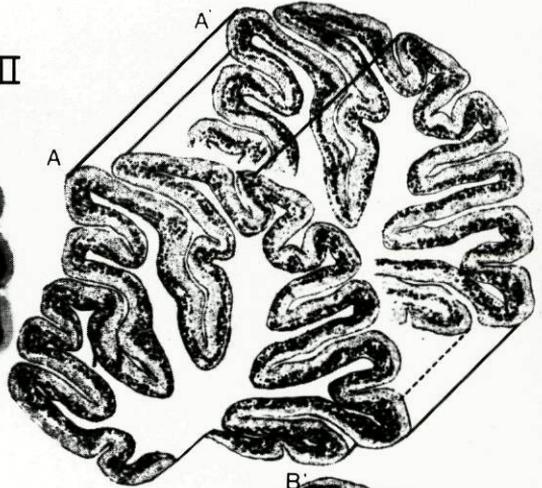
FIGURAS



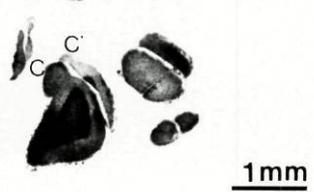
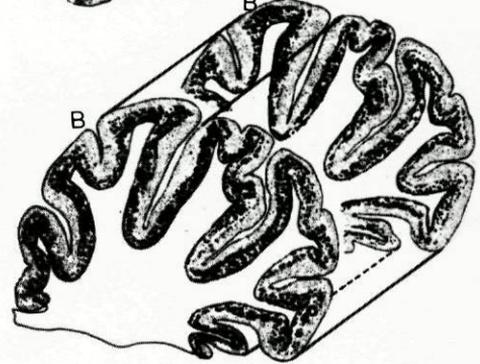
I



II



III



IV

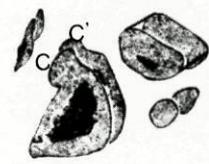


FIG. 1 – Aspecto exterior e foliação do cerebelo de um rato (fotografias e respectivos desenhos). 12 meses controlo.

I – Cerebelo visto pela face superior; indicados (A-A'; B-B'; C-C') os locais correspondentes aos cortes que figuram em II, III e IV.

II – Aspectos de 2 cortes do verme, distantes entre si de 4 cortes.

III – Idem do hemisfério esquerdo.

IV – Aspectos de 2 cortes contíguos do extremo do mesmo hemisfério.

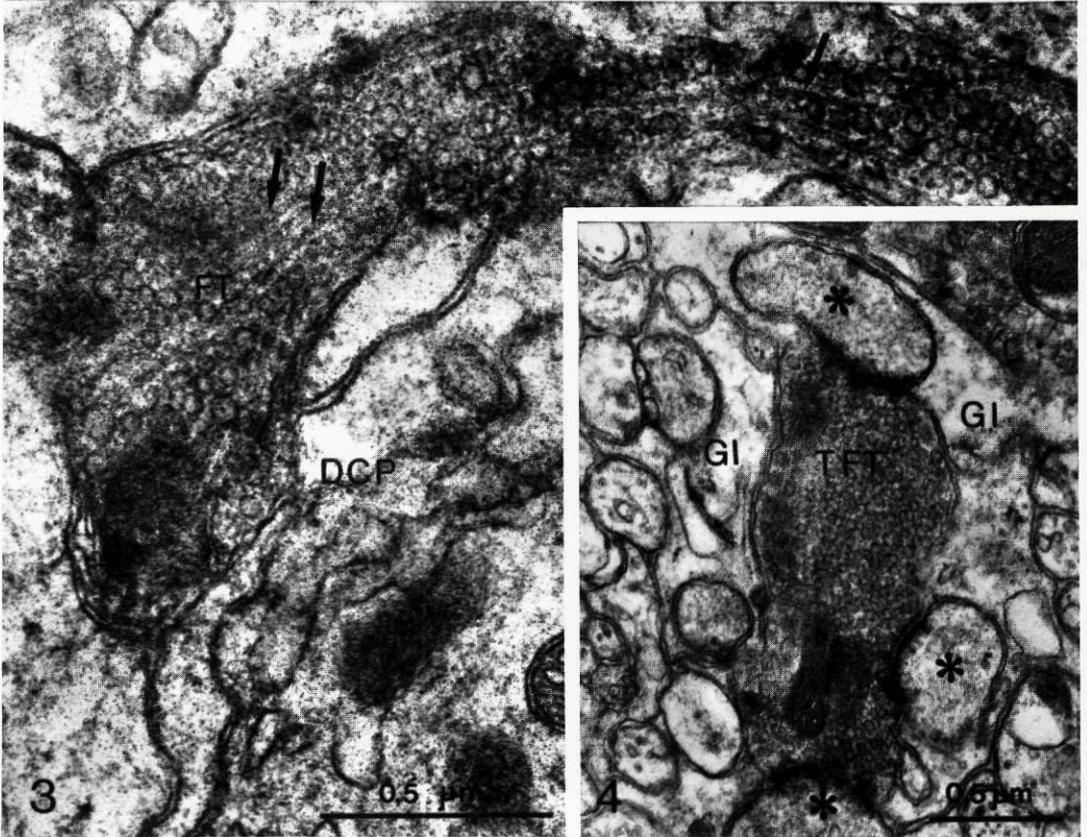
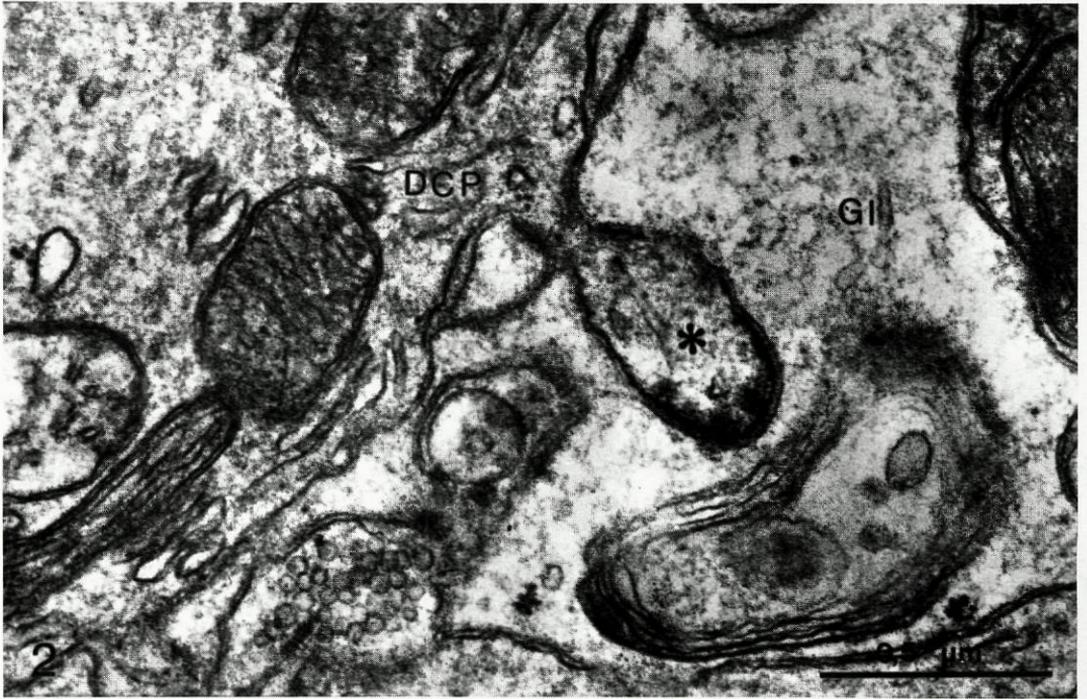


FIG. 2—Perfil de um grande tronco dendrítico de uma célula de Purkinje (DCP) seccionado perpendicularmente ao seu maior eixo.

Espinha dendrítica deafferenciada (asterisco) envolvida por extensos prolongamentos gliais (Gl.). 12 meses de alcoolização.

FIG. 3—Perfil de fibra trepadora (FT) adjacente a um grande dendrito de uma célula de Purkinje (DCP). Observam-se numerosas vesículas sinápticas e microtúbulos (setas). 12 meses de alcoolização.

FIG. 4—Terminal de uma fibra trepadora (TFT) no 1/3 superficial da camada molecular. Estabelece sinapses com espinhas dendríticas de células de Purkinje (asteriscos). O conjunto é envolvido por prolongamentos gliais (Gl.). 18 meses de alcoolização.

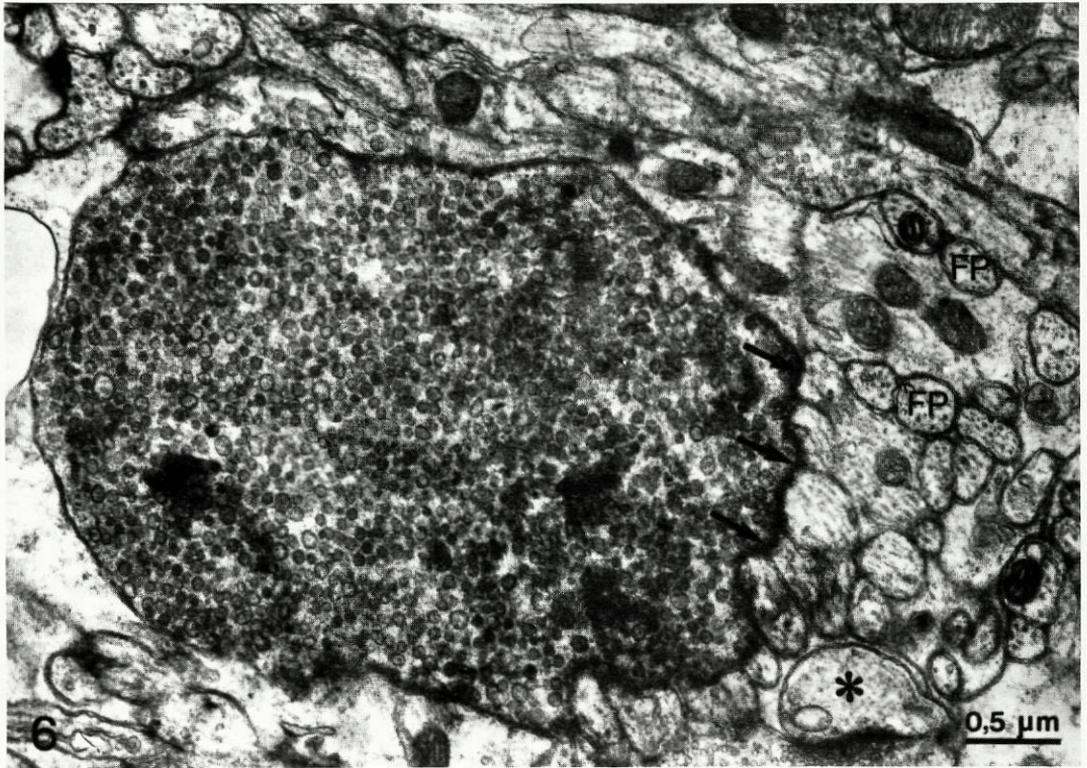
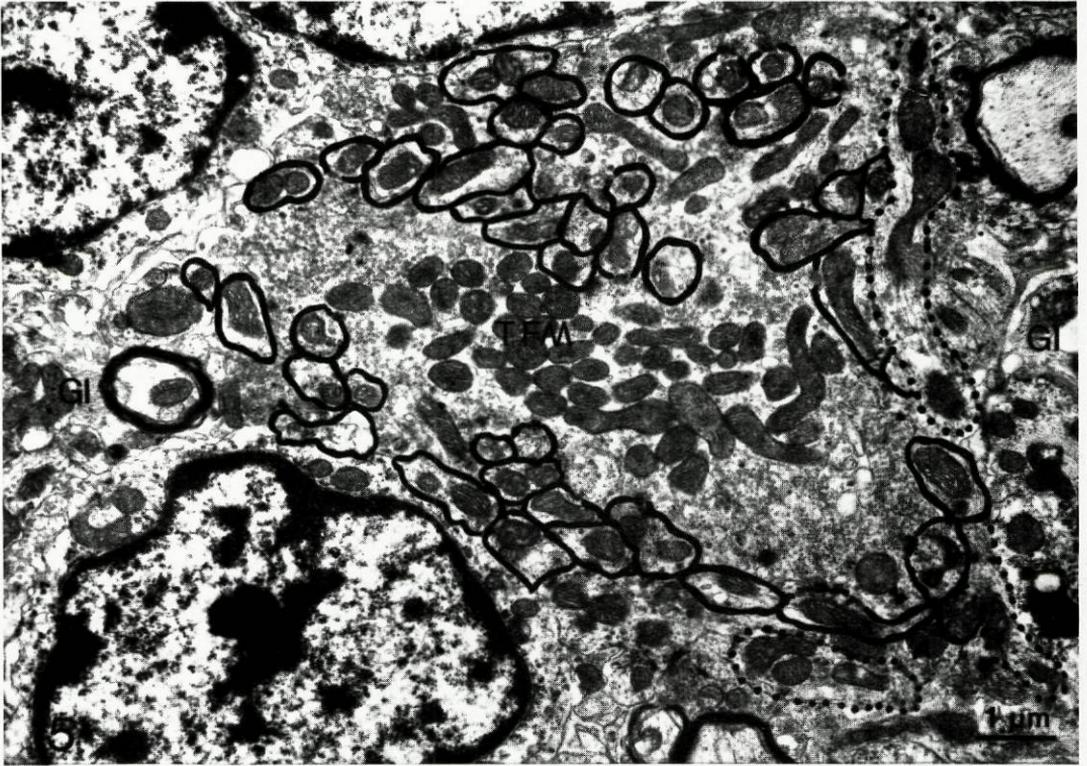
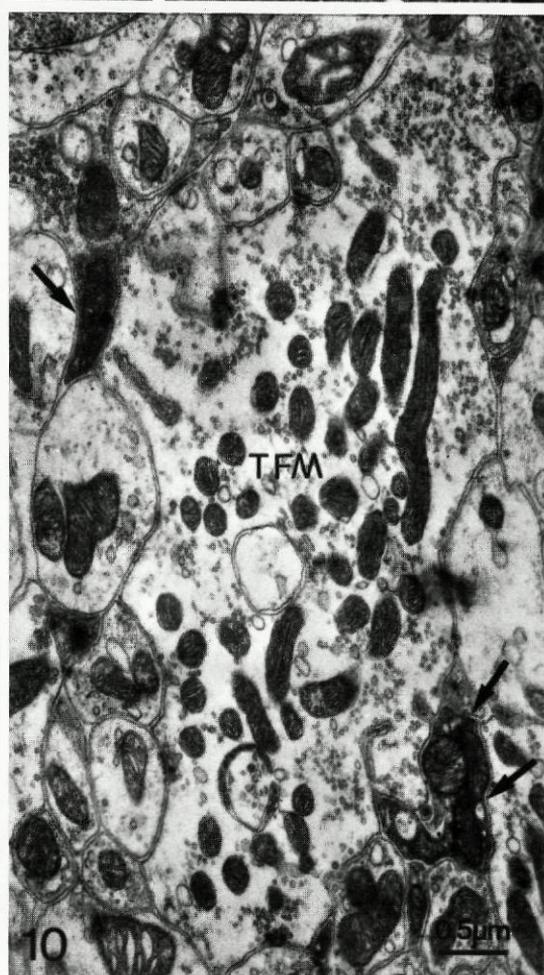
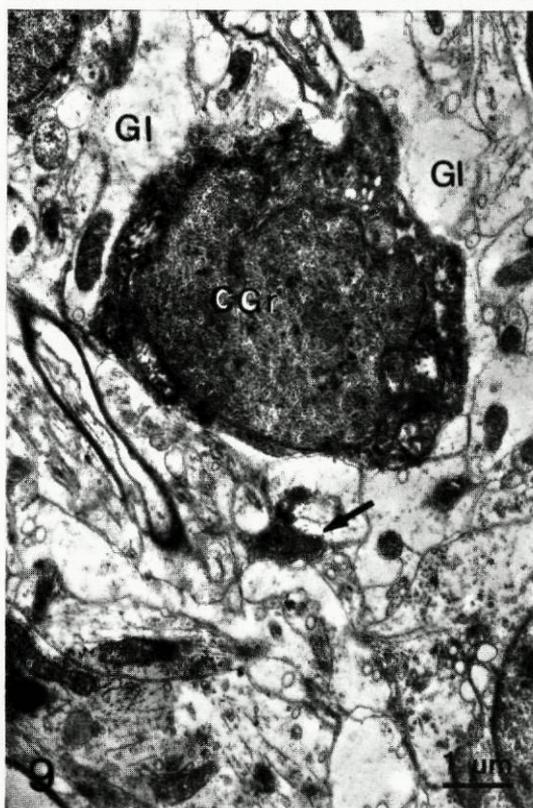
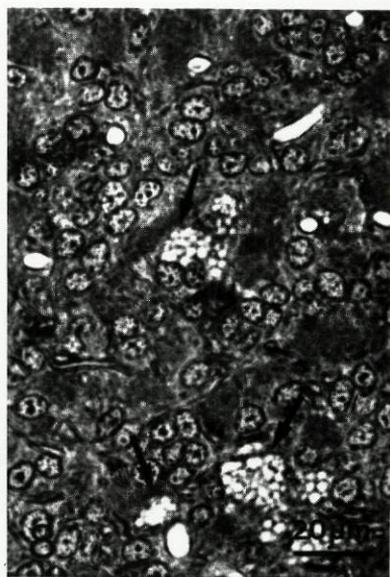
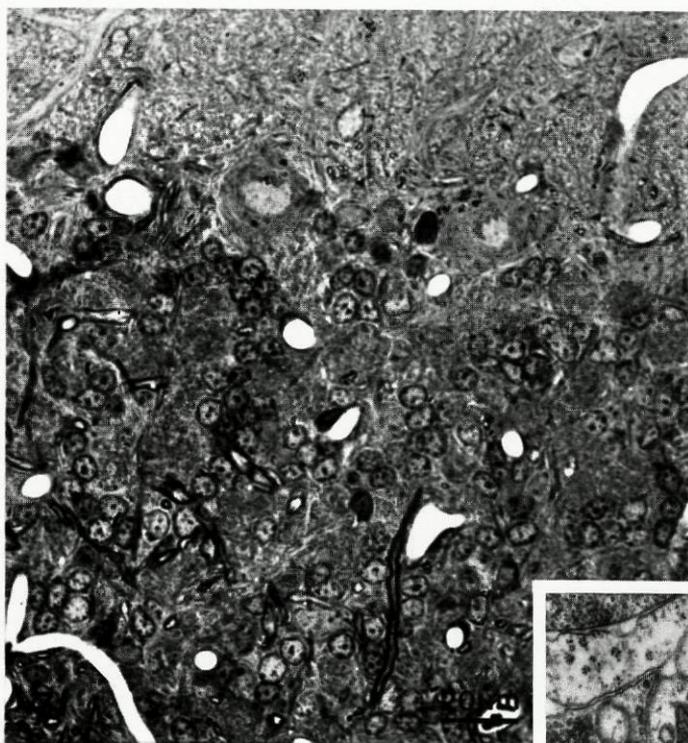


FIG. 5 – Glomérulo cerebeloso. Perfil de terminal de fibra musgosa (TFM) circundado por numerosos perfis dendríticos de células granulares (demarcados a preto). Na periferia do glomérulo, perfis dendríticos de células de Golgi (demarcados a pontuado). Prolongamentos gliais (Gl). 6 meses de controlo.

FIG. 6 – Perfil de terminal provavelmente pretencente a fibra musgosa localizado na camada molecular. Marcado espessamento subplasmalémico (setas). Espinha de célula de Purkinje (asterisco). Fibras paralelas (FP). 18 meses de alcoolização.



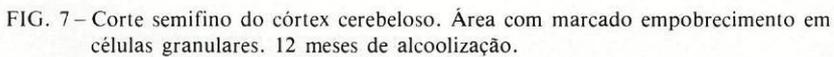


FIG. 7 – Corte semifino do córtex cerebeloso. Área com marcado empobrecimento em células granulares. 12 meses de alcoolização.

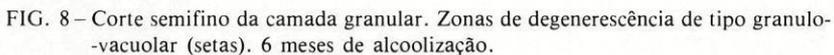


FIG. 8 – Corte semifino da camada granular. Zonas de degenerescência de tipo granulo-vacuolar (setas). 6 meses de alcoolização.

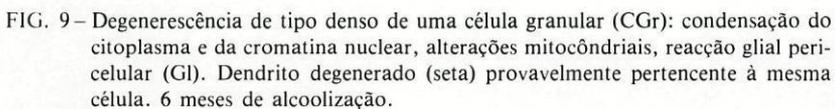


FIG. 9 – Degenerescência de tipo denso de uma célula granular (CGr): condensação do citoplasma e da cromatina nuclear, alterações mitocondriais, reacção glial pericelular (Gl). Dendrito degenerado (seta) provavelmente pertencente à mesma célula. 6 meses de alcoolização.

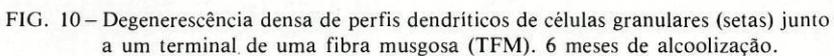


FIG. 10 – Degenerescência densa de perfis dendríticos de células granulares (setas) junto a um terminal de uma fibra musgosa (TFM). 6 meses de alcoolização.

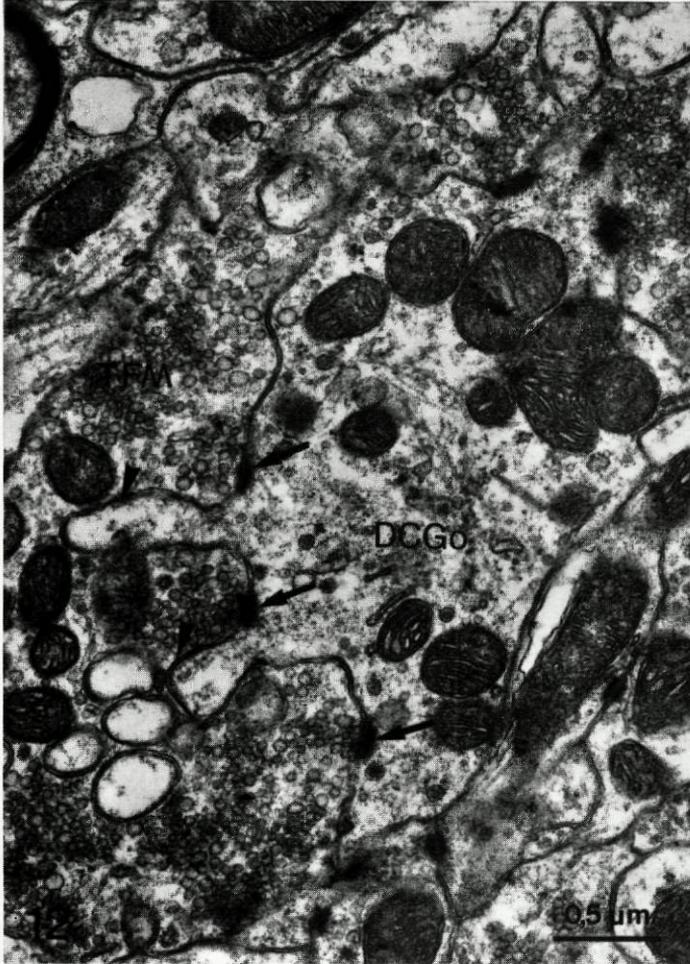
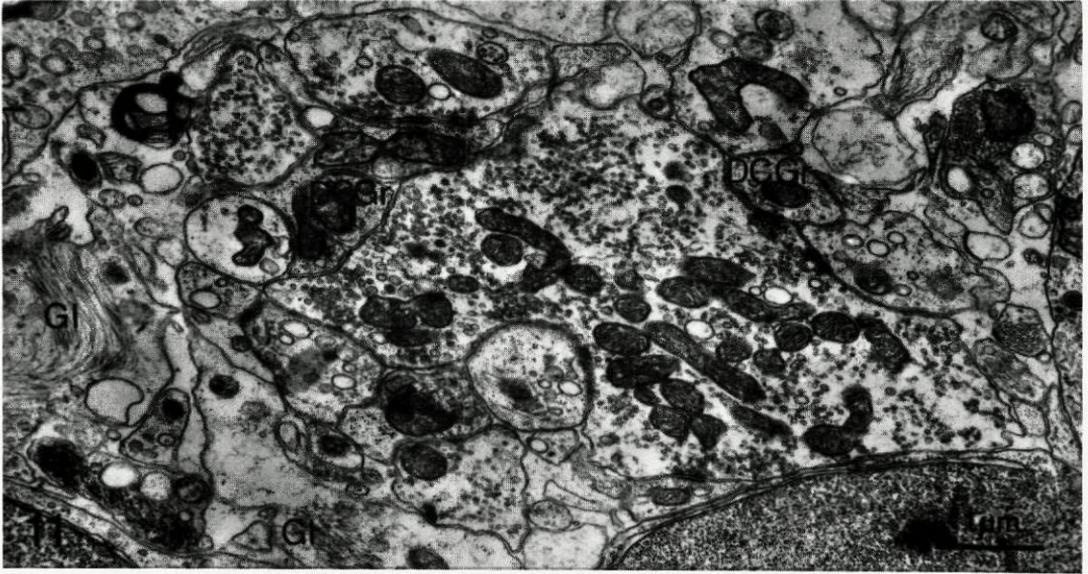


FIG. 11 – Glomérulo cerebeloso com poucos dendritos de células granulares (DCGr.). Abundantes prolongamentos gliais (Gl) à periferia do glomérulo. 12 meses de alcoolização.

FIG. 12 – Terminal de fibra musgosa (TFM). Sinapses entre este (setas) e um perfil dendrítico de célula de Golgi (DCGo). Evaginações do dendrito (pontas de seta) no terminal. 12 meses de alcoolização.

FIG. 13 – Sinapse “en marron” entre terminal de fibra musgosa (TFM) e dendrito de célula de Golgi (DCGo). Múltiplas zonas especializadas (setas) com espessamentos pós-sinápticos de grandes dimensões (pontas de seta). 18 meses de alcoolização.

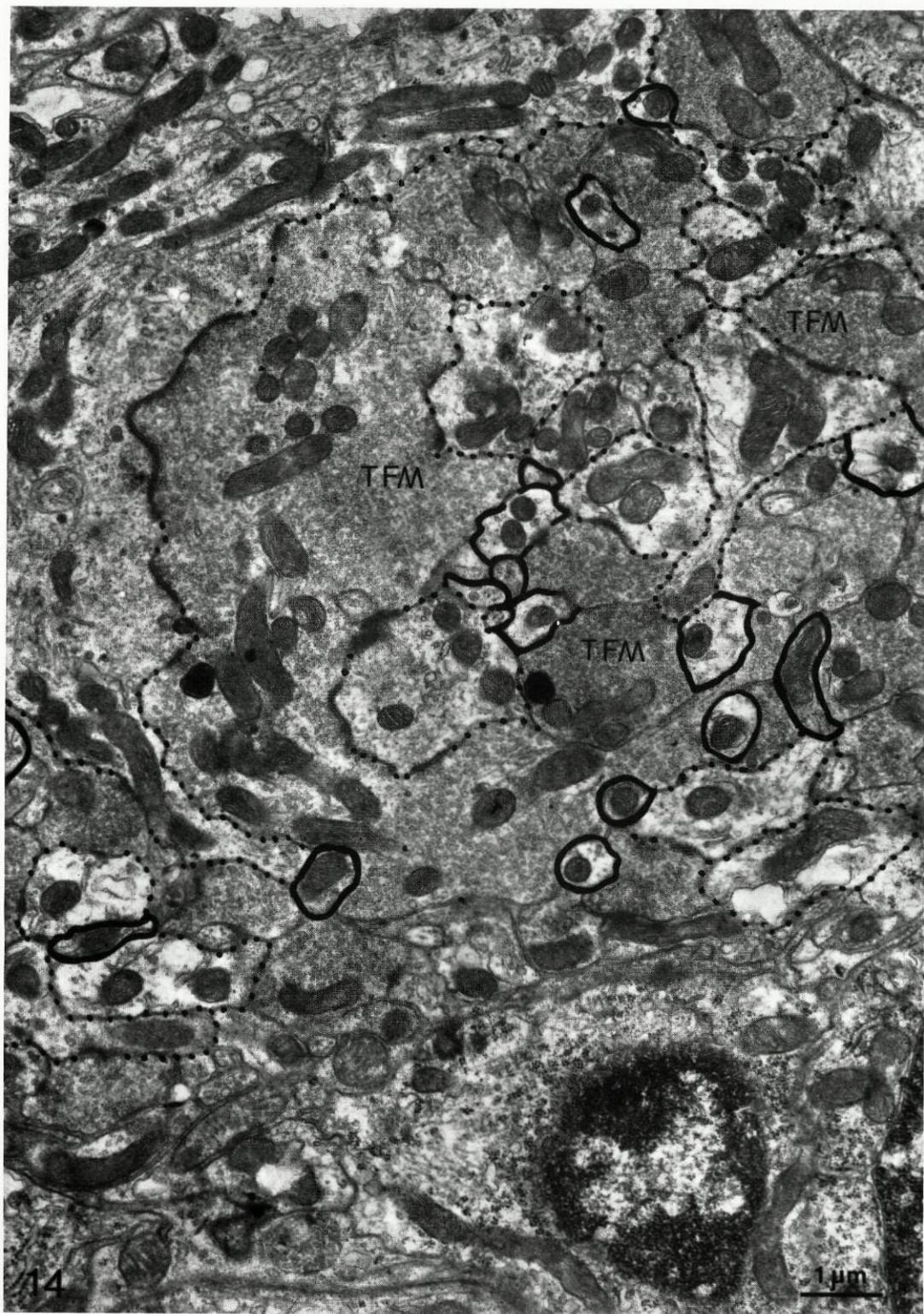


FIG. 14 – Glomérulo cerebeloso com número reduzido de perfis dendríticos de células granulares (demarcados a preto). Observam-se numerosas e extensas sinapses entre perfis de terminais de fibras musgosas (TFM) e dendritos de células de Golgi (demarcados a pontuado). 18 meses de alcoolização.

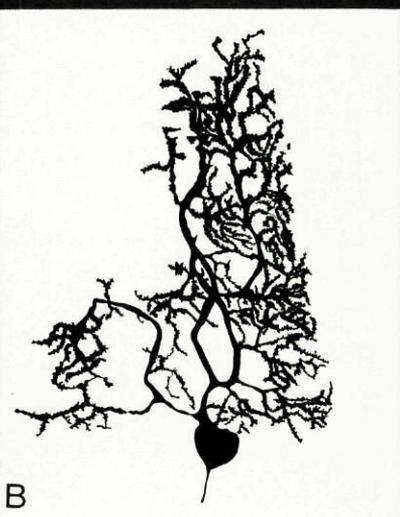
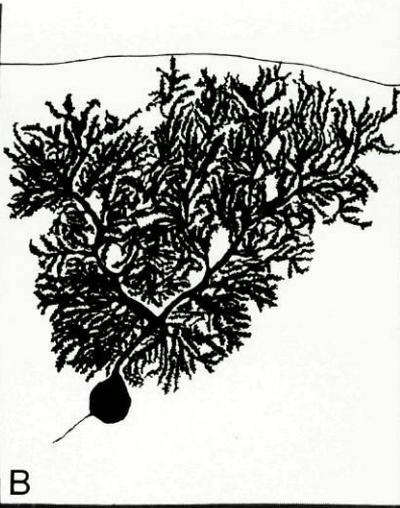


FIG. 15 – Fotografia de célula de Purkinje (A) e respectivo desenho à câmara clara (B). 6 meses de controlo.

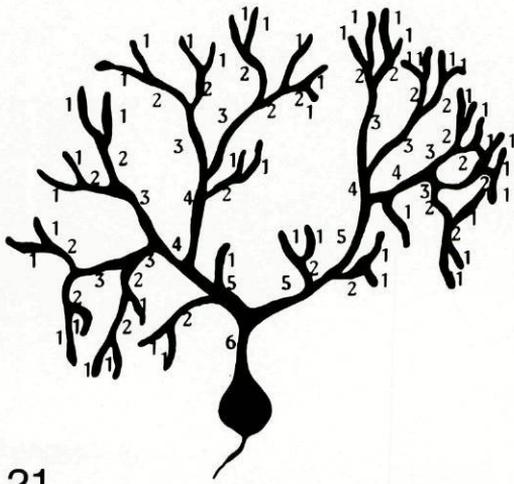
FIG. 16 – Ramos periféricos da mesma célula, cobertos por espinhas dendríticas. 6 meses de controlo.

FIG. 17 – Fotografia de célula de Purkinje (A) e respectivo desenho à câmara clara (B). Marcado empobrecimento da ramificação dendrítica. 6 meses de alcoolização.

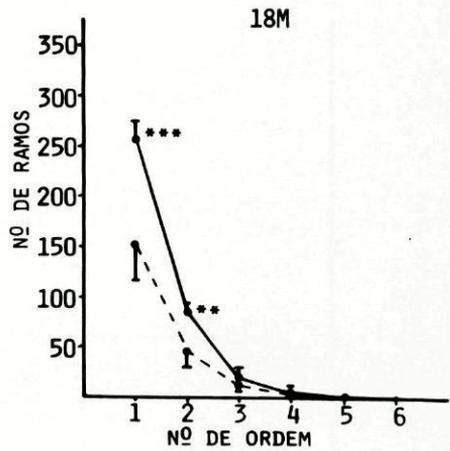
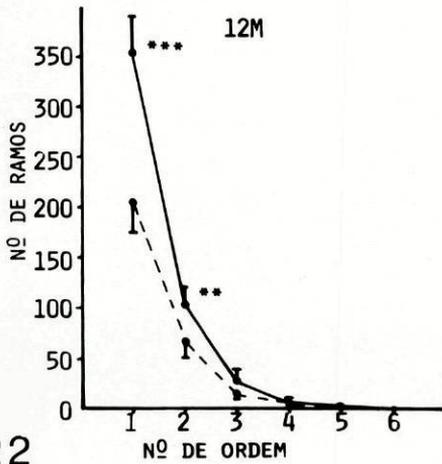
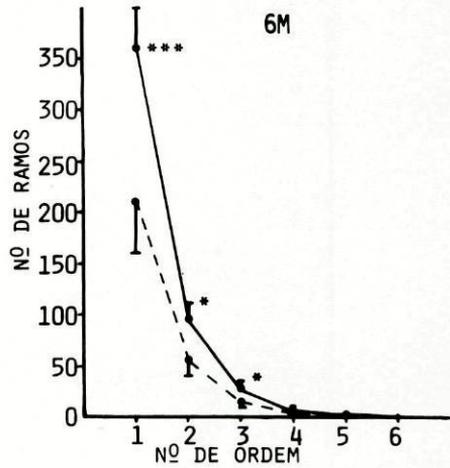
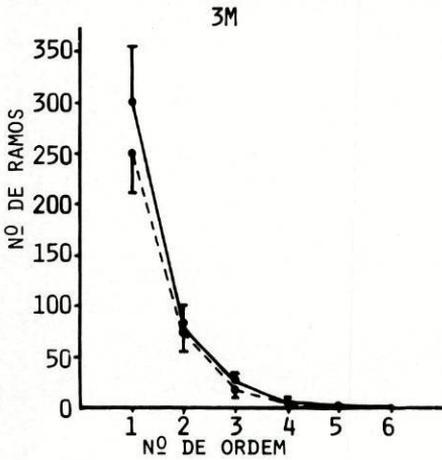
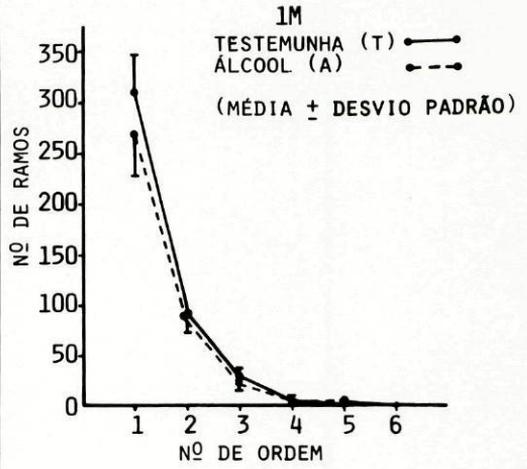
FIG. 18 – Ramos periféricos da mesma célula com número reduzido de espinhas dendríticas. 6 meses de alcoolização.

FIG. 19 – Montagem fotográfica de uma célula de Purkinje (A) e respectivo desenho à câmara clara (B). Organização geral da arborização dendrítica diferente da normal, com orientação inusual dos ramos dendríticos. 12 meses de alcoolização.

FIG. 20 – Ramos periféricos da mesma célula com número reduzido de espinhas dendríticas. 12 meses de alcoolização.



21



22

FIG. 21 – Representação diagramática de uma célula de Purkinje ordenada segundo o método de Strahler.

FIG. 22 – Representação gráfica, em cada período da experiência, do número médio de segmentos dendríticos de cada ordem nas células de Purkinje ordenadas segundo o método de Strahler.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$

A barra vertical representa 1 desvio-padrão.

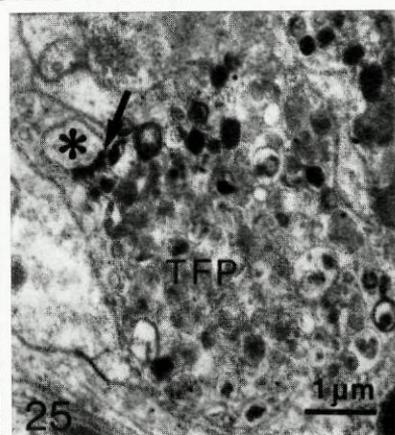
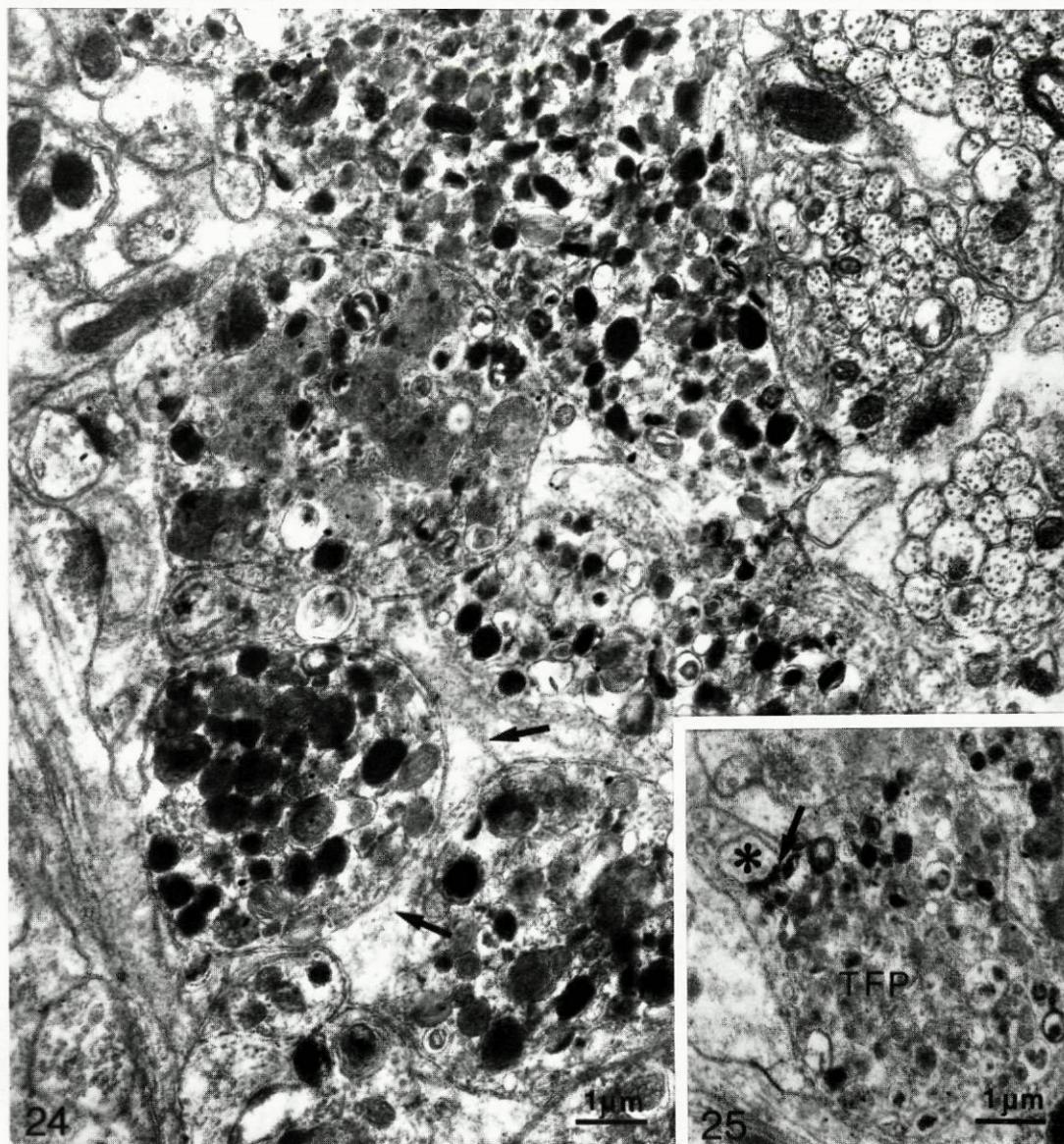
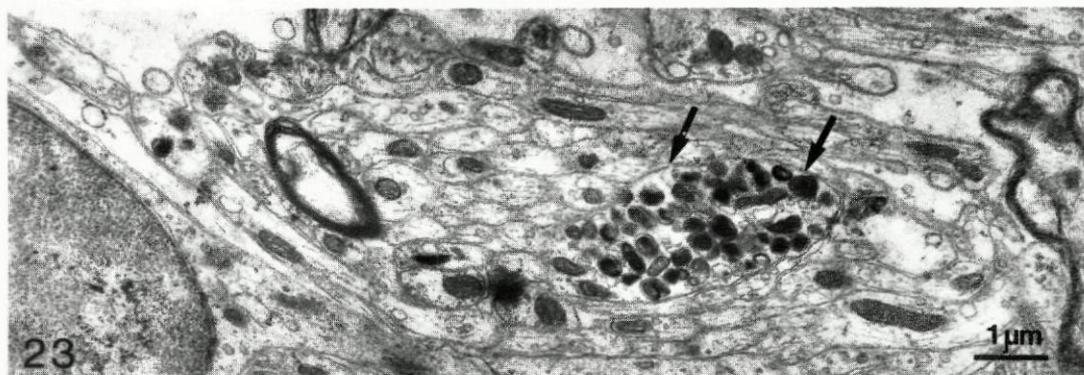
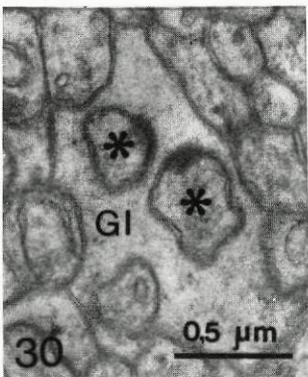
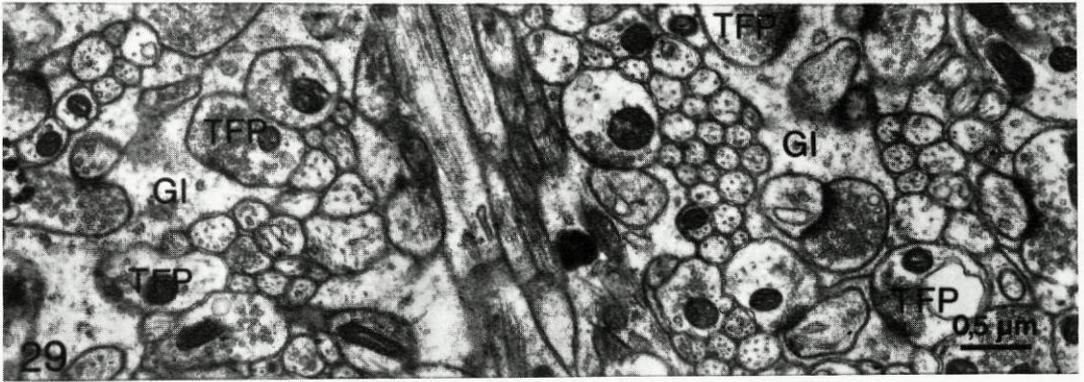
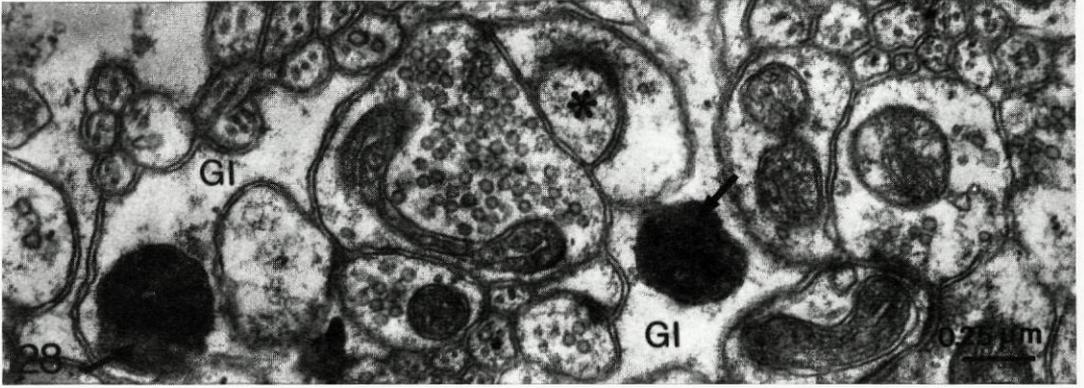
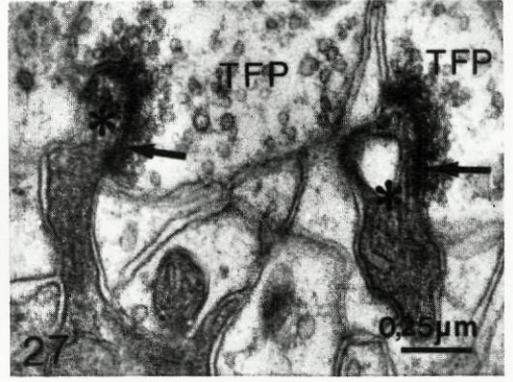
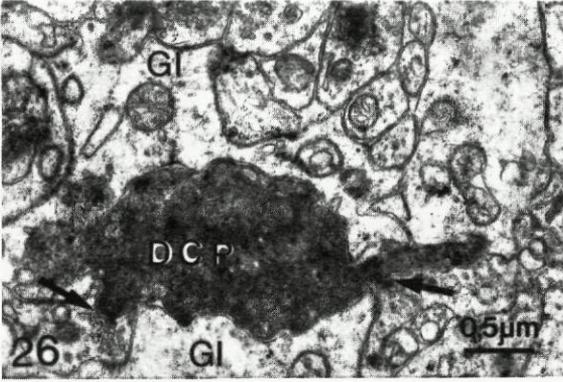


FIG. 23 – Perfil distrófico (setas) na camada molecular, contendo numerosos corpos densos. 3 meses de alcoolização.

FIG. 24 – Placa senil do tipo primitivo no 1/3 profundo da camada molecular. Numerosos corpos densos e lamelares e grânulos de lipofuscina nos perfis distróficos. Material fibrilar (setas) entre alguns deles. 6 meses de alcoolização.

FIG. 25 – Parte de uma placa senil. Terminal de fibra paralela (TFP) em contacto sináptico (seta) com espinha dendrítica de uma célula de Purkinje (asterisco). 6 meses de alcoolização.



- FIG. 26 – Dendrito em degenerescência de uma célula de Purkinje (DCP) envolvido por prolongamentos gliais (Gl). Matriz densa, organelos dificilmente identificáveis. Sinapses (setas) com terminais de fibras paralelas. 6 meses de alcoolização.
- FIG. 27 – Dendrito e espinhas em degenerescência (asteriscos) de célula de Purkinje. Sinapses (setas) entre os terminais das fibras paralelas (TFP) e as espinhas. 6 meses de alcoolização.
- FIG. 28 – Área da camada molecular contendo perfis degenerados de fibras paralelas (setas) envolvidos por prolongamentos gliais (Gl). Espinha dendrítica deaferenciada (asterisco). 6 meses de alcoolização.
- FIG. 29 – Área da camada molecular contendo terminais de fibras paralelas (TFP) desprovidos de estrutura pós-sináptica. Em sua substituição vêm-se prolongamentos gliais (Gl). 12 meses de alcoolização.
- FIG. 30 – Espinhas dendríticas deaferenciadas de células de Purkinje (asteriscos), envolvidas por prolongamentos gliais (Gl). 6 meses de alcoolização.
- FIG. 31 – Perfil de espinha dendrítica deaferenciada (asterisco) envolvida por prolongamentos gliais (Gl). Terminal de fibra paralela (TFP) com espessamento pré-sináptico (setas) face a um prolongamento glial (Gl). 18 meses de alcoolização.

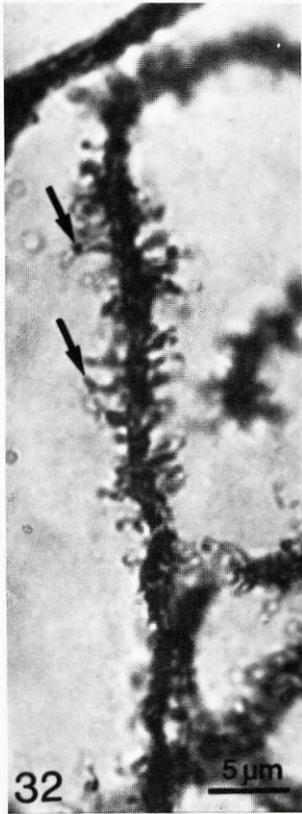


FIG. 32— Ramos dendríticos de uma célula de Purkinje impregnados pelo método de Golgi. Espinhas dendríticas finas e de grandes dimensões (setas). 6 meses de alcoolização.

FIG. 33— Aspecto idêntico ao anterior. 6 meses de alcoolização.

FIG. 34— Perfil de um dendrito de uma célula de Purkinje (DCP). Espinha dendrítica alongada (asterisco), de colo fino, contendo elementos do retículo endoplasmático liso (setas). Na base vê-se uma vesícula revestida (ponta de seta). 12 meses de alcoolização.

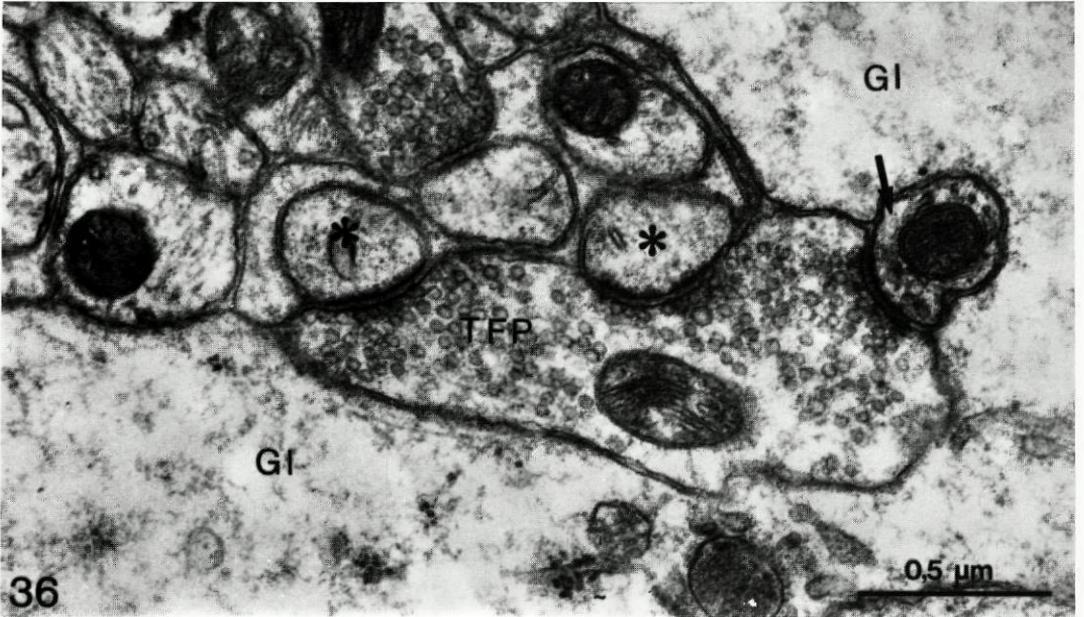
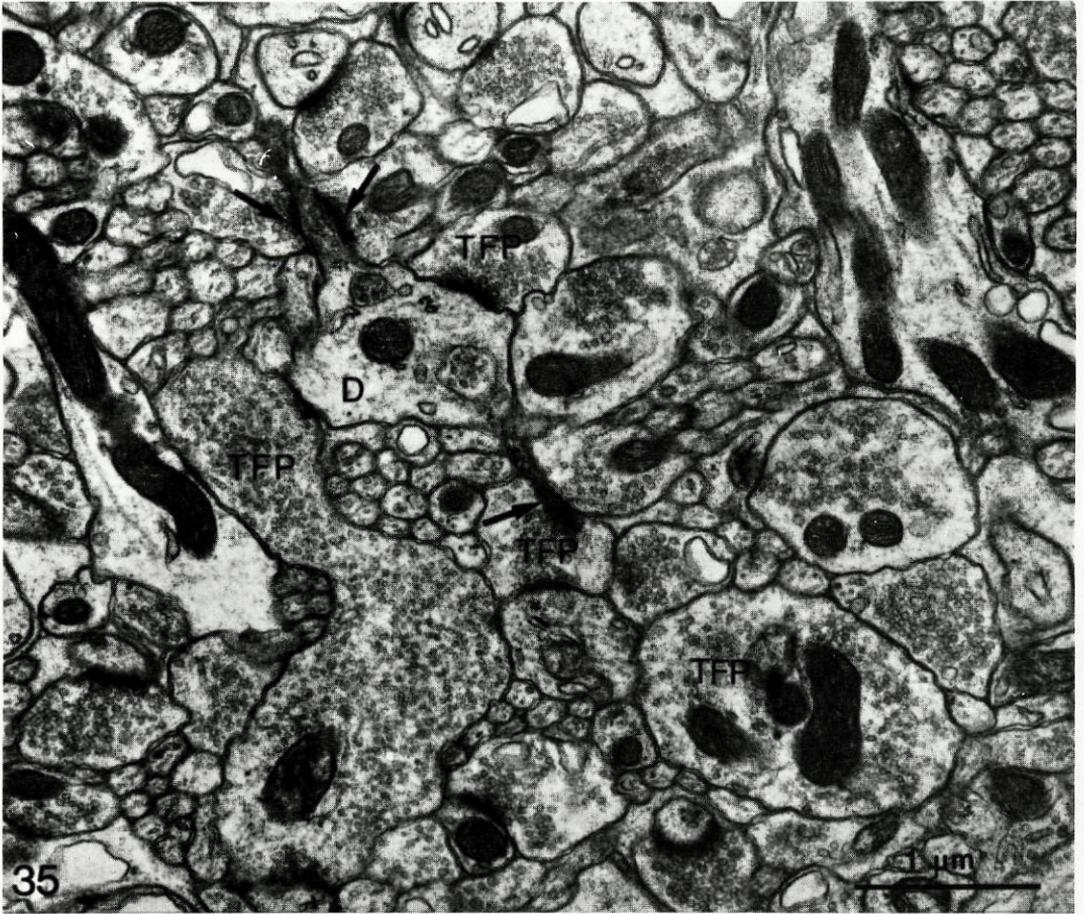


FIG. 35 – Área da camada molecular com numerosos terminais de fibras paralelas (TFP) de grandes dimensões e repletos de vesículas. Assinalado (D) um perfil dendrítico com prolongamentos do tipo dos de “cones” de crescimento (setas) em contacto sináptico com terminais de fibras paralelas (TFP). 18 meses de alcoolização.

FIG. 36 – Terminal de uma fibra paralela (TFP) rodeado por prolongamentos gliais (Gl). Contactos sinápticos com duas espinhas dendríticas de células de Purkinje (asteriscos) e com um dendrito de um interneurónio (seta). 18 meses de alcoolização.

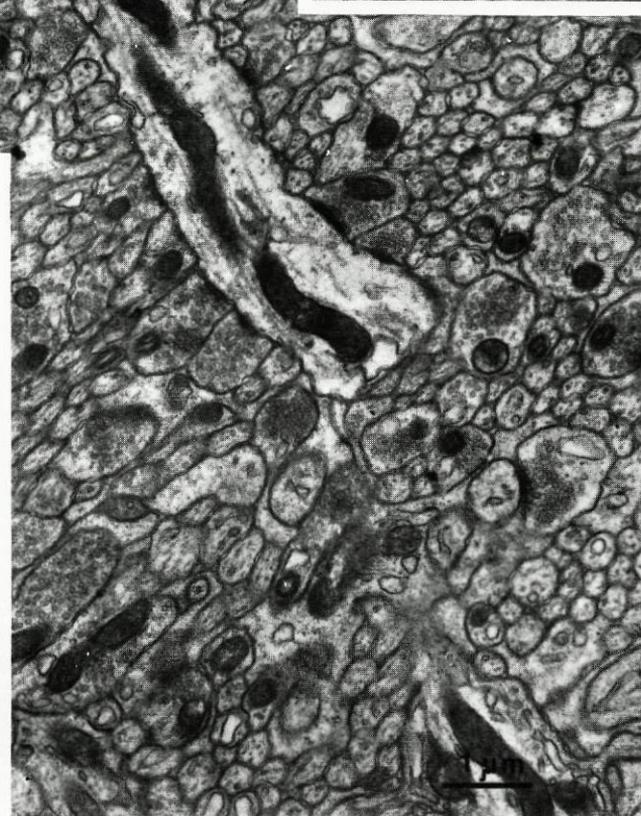
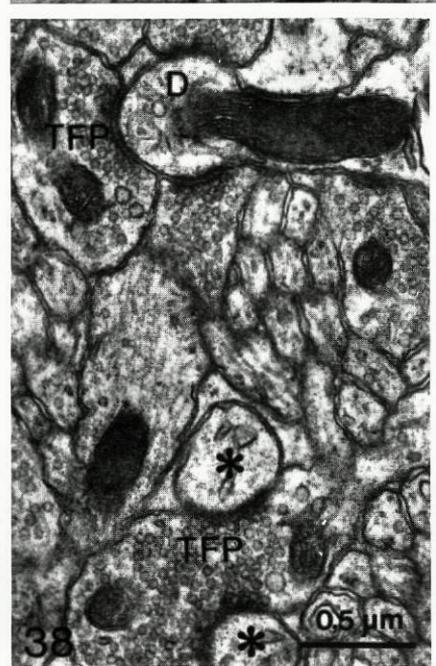
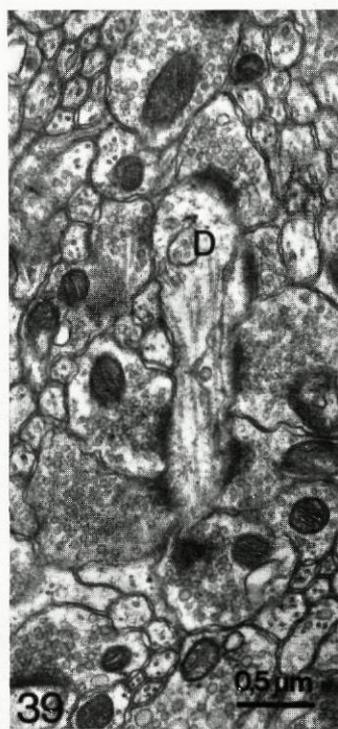
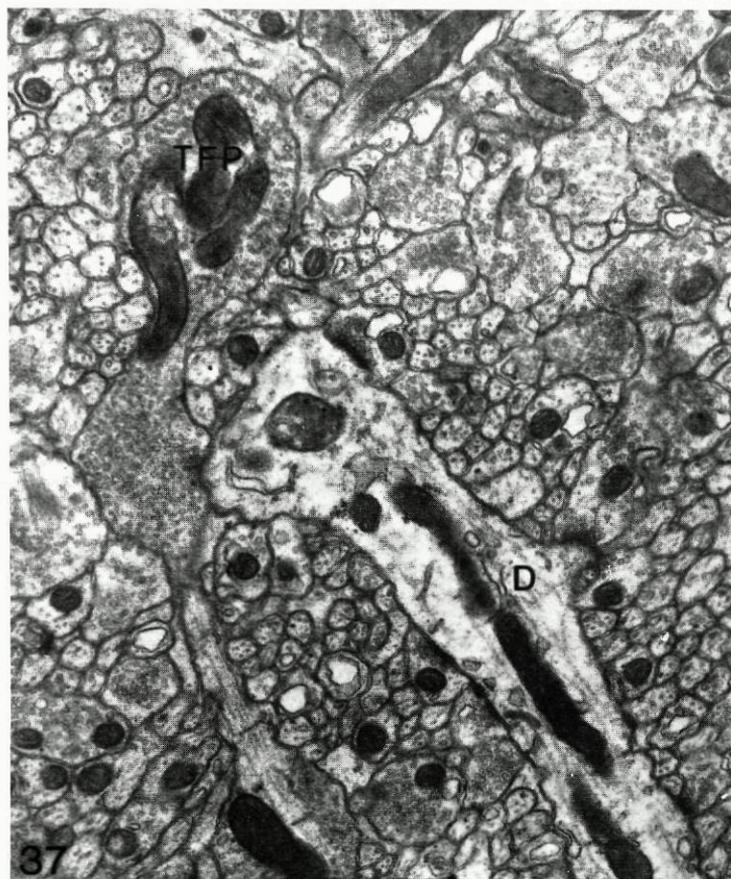


FIG. 37 – Área da camada molecular com perfis de terminais de fibras paralelas (TFP) de grandes dimensões e repletos de vesículas sinápticas. Dendrito de interneurónio (D) coberto de sinapses com terminais de fibras paralelas. 12 meses de alcoolização.

FIG. 38 – Terminais de fibras paralelas (TFP) estabelecendo contactos sinápticos com um dendrito de interneurónio (D). Terminal de fibra paralela (TFP) em conexão sináptica com duas espinhas dendríticas de células de Purkinje (asteriscos). 12 meses de alcoolização.

FIG. 39 – Dendrito de interneurónio (D) com múltiplos contactos sinápticos, numa pequena extensão de membrana plasmática. 18 meses de alcoolização.

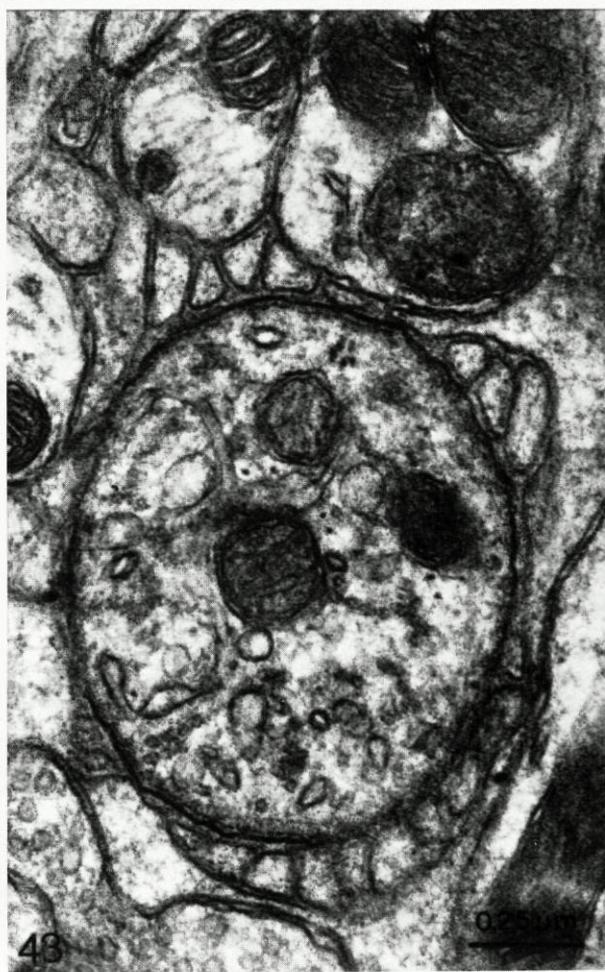
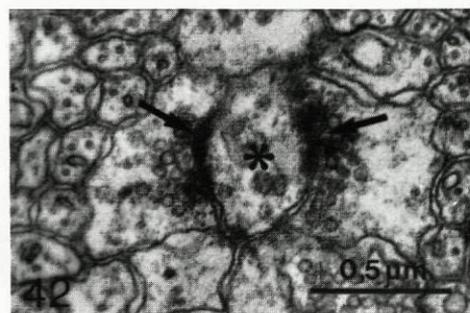
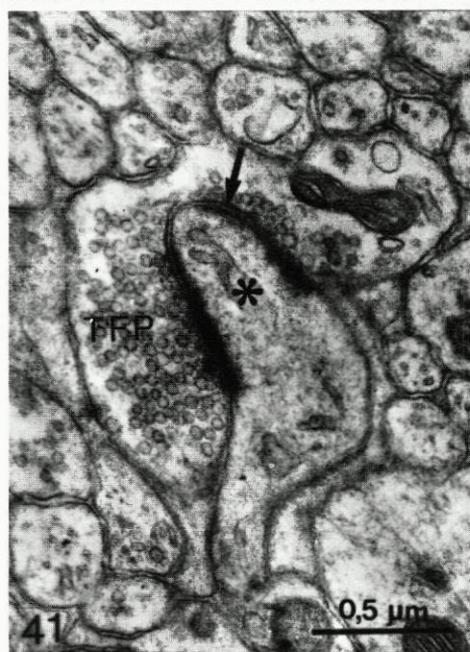
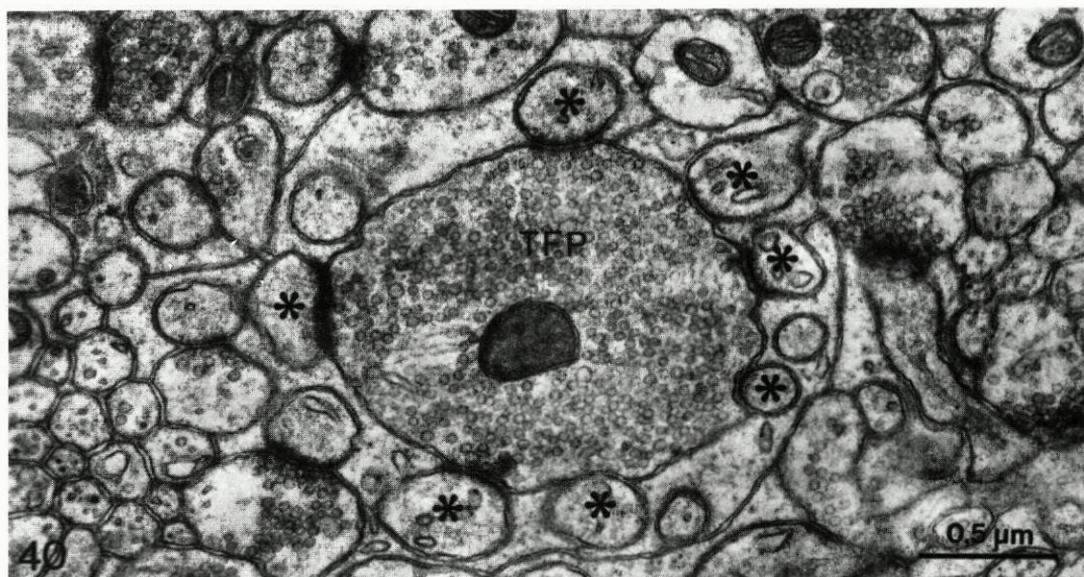


FIG. 40 – Terminal de fibra paralela (TFP) de grandes dimensões. Contactos sinápticos com diferentes espinhas dendríticas de células de Purkinje (asteriscos). 12 meses de alcoolização.

FIG. 41 – Espinha dendrítica de uma célula de Purkinje (asterisco) envolvida por um terminal de uma fibra paralela (TFP). Extensa zona de contacto sináptico (seta). 18 meses de alcoolização.

FIG. 42 – Perfil de espinha dendrítica de uma célula de Purkinje (asterisco) onde se observam dois contactos sinápticos (setas). 12 meses de alcoolização.

FIG. 43 – Segmento inicial do axónio de uma célula de Purkinje cortado perpendicularmente ao seu maior eixo, onde não se vislumbram alterações. 12 meses de alcoolização.

DISCUSSAO

Os resultados obtidos mostram claramente que no Rato adulto, a administração excessiva e prolongada de álcool provoca profundas alterações nos circuitos neuronais do córtex cerebeloso. São evidentes quer a nível dos pericários dos neurónios que integram esses circuitos, quer a nível dos seus prolongamentos, incluindo as zonas de contacto sináptico.

Se já em 1959 Victor e col. (266) descreveram pormenorizadamente alterações da estrutura cerebelosa em alcoólicos crónicos, não deixa de ser surpreendente, dadas as marcadas implicações sociais, sanitárias e neurológicas do alcoolismo crónico, a quase inexistência de experimentação laboratorial em animais adultos que complementasse e aprofundasse as teses expressas por aqueles autores.

Com efeito, os estudos necrópsicos enfermam de condicionalismos tais como a má preservação dos tecidos a observar (286) e a concorrência, no caso do alcoolismo crónico, de factores nutritivos (264, 265, 266) ou outros, que podem provocar, por si só, lesões mais ou menos intensas das células nervosas.

Nesta perspectiva, tentaram criar-se as condições de experimentação necessárias para ultrapassar tais dificuldades, recorrendo-se a um modelo animal que possibilitasse longos períodos de alcoolização e onde fossem minimizados os condicionalismos referidos.

Animais e Dietas

Reconhece-se que o modelo animal de alcoolização crónica desenvolvido e utilizado neste estudo ainda não é o ideal;

não incluiu certas condições de alguma relevância neste tipo de experimentação (48, 49, 132). Porém, preenche os seus requisitos básicos e tornou possível tornar as dificuldades e cumprir com uma base metodológica sólida os diferentes objectivos a que este estudo se propunha. Conseguiu-se, assim, estudar grupos de animais alcoolizados durante períodos muito longos, até 18 meses, de modo prático, com baixos índices de mortalidade e sem necessidade de grandes manipulações. Em paralelo, foi possível dispor, para cada período de alcoolização, de grupos de animais testemunha nutricionalmente controlados em relação aos respectivos animais alcoolizados. Evitaram-se, por outro lado ou, pelo menos, atenuaram-se as eventuais deficiências vitamínicas e de sais minerais que se sabe ocorrerem nestas circunstâncias (102, 297) através do seu fornecimento suplementar na água de bebida e na solução alcoólica. Deste modo, os animais alcoolizados e os respectivos animais testemunha não mostravam, ao fim de cada período experimental, sinais físicos evidentes de má-nutrição e o consumo de álcool calculado diariamente em função do peso do animal foi suficiente para provocar dependência, diagnosticada pela sintomatologia patenteada nas ocasiões em que os animais ingeriam menor quantidade de solução alcoólica (83, 88). Por último, sublinhe-se que as alcoolémias obtidas, indicavam ingestão abundante de álcool, ainda que irregular, ao longo da experiência.

Neste modelo de alcoolismo crónico utilizou-se o Rato como animal de experiência. A selecção da espécie a utilizar foi criteriosamente ponderada atendendo, como é óbvio, a que o animal ideal para estes estudos deveria absorver, metabolizar e eliminar a droga de modo semelhante ao Homem (49). Como nenhuma espécie animal preenche a totalidade destes requisitos (268) houve que analisar, para cada uma das que se poderia ter usado, as vantagens e inconvenientes respectivos. No caso do Rato desconhecem-se factores de índole metabólica que contraindiquem a sua utilização (213). Acresce que é um dos animais mais acessíveis e de mais económica manutenção, o que permite obter amostras numerosas. Pesaram também os conhecimentos prévios sobre a estrutura do córtex cerebeloso deste animal, obtidos anteriormente em trabalhos qualitativos e quantitativos

(171, 172, 177, 209, 210), que possibilitariam uma valorização mais profunda dos resultados que eventualmente se viessem a obter. Feita a escolha, teve-se ainda o cuidado de se trabalhar sempre na mesma estirpe, factor não menos importante, por se saber que no Rato há profundas diferenças entre estirpes, não só quanto à morfologia mais fina do córtex cerebeloso (106, 107, 128), como também quanto à facilidade de ingestão de soluções alcoólicas (150, 203).

Os ratos utilizados foram do sexo masculino. A esta escolha não foram alheias as marcadas diferenças sexuais que se sabe existirem no metabolismo do etanol nesta espécie (73, 195). Com efeito, os ratos machos, quando alcoolizados, exalam maiores quantidades de acetaldéido que as fêmeas (195) que, pelo contrário, apresentam maiores concentrações deste metabolito no sangue (73).

Situação idêntica se verifica no Homem, onde se identificaram marcadas diferenças sexuais na resposta à ingestão de iguais quantidades de álcool (158, 285), o que leva a admitir poder haver paralelismo nas cadeias de degradação do etanol no Rato e no Homem.

No modelo adoptado não se incluiu um terceiro grupo de animais de controlo que tivessem ingerido água e alimentos sólidos «ad libitum» (186, 201, 202, 272, 273, 274, 275). A sua inclusão, numa experimentação deste tipo, basear-se-ia no facto de os animais de controlo ingerirem menores quantidades de alimentos do que seria de esperar em animais com livre acesso aos alimentos e daí resultaria a necessidade de comparação entre os dois tipos de controlo. No entanto, verificou-se que o recurso a 3 grupos de animais no estudo de alterações morfológicas induzidas no sistema nervoso pelo consumo crónico de álcool (186, 201, 202, 272, 273, 274, 275) é dispensável, atendendo a que se têm mostrado quase inexistentes as diferenças entre os dois tipos de grupos de controlo referidos, mesmo após períodos longos de consumo de álcool. Assim procederam McMullen e col. (151) em experimentações de longa duração, ao utilizarem somente 2 grupos de animais. Refira-se, porém, não haver experiências com duração tão prolongada como a presente e consequentemente as consi-

derações adiantadas não poderem ser aplicadas rigorosamente aos animais submetidos a 18 meses de alcoolização. Nestes casos não pode excluir-se que o factor má-nutrição esteja também implicado nas alterações encontradas. Porém, em desabono desta hipótese, existem as observações feitas em grupos de animais submetidos a dieta deficiente em proteínas (8% caseína) durante 6, 12 e 18 meses e comparação com os respectivos controlos que mostram alterações do córtex cerebeloso nos animais hiponutridos, mas de tipo morfológico diferente das dos ratos alcoolizados (180).

Não foi possível fazer o estudo das variações das alcoolémias ao longo do dia, nem tão pouco no decurso dos diferentes períodos experimentais, por impossibilidade técnica de usar os processos mais adequados a estas determinações (243). Saliente-se, no entanto, que os resultados obtidos na altura do sacrifício dos animais, embora inferiores aos encontrados com outros modelos, nomeadamente nos que utilizam dietas líquidas como veículo para o álcool (136, 257) são compatíveis com a existência de elevadas alcoolémias, provavelmente em consequência de ingestão crónica e não da ingestão isolada verificada no período que antecedeu a morte. Na última fase da experiência, dos 12 para os 18 meses, o consumo médio diário de álcool era menor, embora não diferisse significativamente quando comparado com o encontrado nos restantes períodos. Este facto poderá estar relacionado com a idade dos animais (295). No entanto, ainda hoje é grande a controvérsia quanto às quantidades de álcool consumidas pelos animais conforme a idade (294, 295). Uns estudos mostram que os animais mais velhos ingerem menos álcool do que os mais jovens (92, 293); outros, pelo contrário, descrevem aumento do consumo de álcool nos animais mais idosos (121, 276).

O modelo experimental que se utilizou é, em certos aspectos, semelhante ao apresentado em trabalho publicado depois do início deste projecto de investigação, por Lee e col. (130). Neste, a solução alcoólica é concentrada a 10% e a alimentação é fornecida sob a forma de pó, sendo, por isso,

mais facilmente efectuado o controlo nutricional dos animais testemunha. Note-se, porém, que o período experimental naquele estudo não ultrapassa as 18 semanas, o que reforça a ideia, que se colhe da literatura, das dificuldades de obtenção de animais submetidos a alcoolização por períodos longos. Os resultados que aqueles autores obtiveram são idênticos aos agora encontrados nos animais submetidos a iguais períodos de alcoolização, embora o consumo de álcool fosse superior aos valores médios aqui referidos, o que deverá estar directamente relacionado com a utilização de diferentes concentrações de álcool etílico (130, 200).

O fornecimento de etanol na água de bebida tem sido um dos métodos mais utilizados para o estudo experimental dos efeitos do álcool (124, 130, 154, 198, 277). São modelos económicos e simples que possibilitam a utilização de número muito elevado de animais. Têm ainda as vantagens de, a via de administração oral do neurotóxico, ser a mesma utilizada pelo Homem e a de se conseguirem períodos de experimentação muito longos.

Têm, no entanto, inconvenientes vários, o primeiro dos quais é a aversão natural do Rato à ingestão de soluções alcoólicas (163). Por outro lado, o aumento da concentração de álcool, para cima dos 20%, na água de bebida que poderia ser utilizado para tentar obstar às baixas ingestões, leva a queda brusca dos níveis do seu consumo, e conseqüentemente, da quantidade de calorias ingeridas diariamente pelo animal. Já Richter (199, 200) tinha verificado que a diminuição da concentração de etanol na água de bebida é, por si só, factor determinante de mais consumo. O principal inconveniente deste tipo de alcoolização é, porém, o controlo nutricional dos animais testemunha que, por ser muito moroso e trabalhoso explica que poucos o incluam. De referir ainda que com este tipo de administração são necessários períodos mais prolongados de consumo para a obtenção de alterações morfológicas (272, 273, 274, 275). Por último, a desidratação conseqüente às baixas ingestões de líquido que, por vezes, ocorrem neste modelo, é um factor a ter em conta na análise dos

resultados. É de salientar que os inconvenientes referidos são, no entanto, atenuados pelo facto de se conseguirem ingestões de álcool durante períodos muito prolongados, o que aliás se pretendia no presente trabalho.

Para obviar à série de desvantagens apontadas assistiu-se, nos últimos 20 anos, a múltiplas tentativas para o desenvolvimento de modelos mais completos de alcoolização crónica experimental. Muito se discutiu e discute quanto aos critérios a que devem obedecer esses modelos (48, 49, 132). Porém, e apesar de serem muito numerosos os esforços desenvolvidos, não se conseguiu ainda a nível experimental a desejada homologia com os componentes do alcoolismo humano. É mesmo de prever que provavelmente nunca será atingido este desiderato se se encarar a globalidade de aspectos que o conceito de alcoolismo envolve (155). Admite-se, no entanto, que nem sempre é necessário, sendo por vezes até indesejável, a existência de modelos que contemplem todos os aspectos do alcoolismo humano. Este facto encontra-se bem expresso na análise do conceito de modelo animal de Baldessarini e Fisher (15): «modelo é um compromisso experimental simples utilizado como representativo de uma situação muito mais complexa e a maior parte das vezes menos acessível». São, afinal, soluções que permitem ultrapassar dificuldades éticas, teóricas e práticas inerentes à experimentação humana, e possibilitam ainda o estudo dos efeitos do álcool sem a interferência de outras variáveis como é o caso da má-nutrição, utilização simultânea de outras drogas, coexistência de outras patologias, factores quase sempre associados ao alcoolismo crónico no Homem.

São, como se disse, variadíssimos os modelos experimentais desenvolvidos nos últimos anos; métodos de auto-administração por parte do animal da solução alcoólica por via intra-gástrica (281) ou intravenosa (123), polidipsia psicogénica (116), inalação de vapores de álcool (19, 206) ou ainda intubação dos animais (206). São, sem dúvida, aqueles em que se utilizam as dietas líquidas como veículo do álcool (65, 136, 139, 157, 186, 272, 273, 274, 275) os de uso mais

generalizado. Têm a vantagem de possibilitarem maior consumo de álcool (65, 136, 272, 273, 274, 275) e portanto, a de propiciarem níveis mais elevados e mais constantes de alcoolémia. Permitem ainda assegurar mais facilmente o equilíbrio nutricional dos animais testemunha. Não se põe em dúvida que seriam estes os ideais para o estudo das alterações produzidas pelo consumo de álcool no sistema nervoso. No entanto, o custo elevadíssimo das dietas, quer na fórmula original de Lieber e col. (136, 139, 213) quer utilizando o etanol juntamente com determinados veículos como o Metrecal, Sustacal ou Nutriment (257, 272, 274, 275) torna impraticável a sua utilização por períodos tão prolongados como os do presente estudo. Tentou-se a preparação de dietas desse tipo, com utilização de alimentos que no conjunto possuíssem o mesmo teor calórico das fórmulas atrás referidas (136, 139, 213). Não tiveram, porém, o êxito desejado não só devido à complexidade da preparação das dietas e à necessidade de administração fraccionada, mas também por serem, mesmo assim, muito dispendiosas. Salienta-se, todavia, que ao fim de 6 meses de ingestão deste tipo de dieta, acrescentada de etanol na concentração de 20%, encontraram-se alterações do córtex cerebeloso sobreponíveis às ulteriormente verificadas no modelo que se veio a adoptar.

Em resumo, pensa-se que o modelo experimental desenvolvido para este estudo preenche as condições necessárias à avaliação dos efeitos da administração crónica e prolongada de álcool sobre o sistema nervoso, independentemente de alguns inconvenientes que não pode deixar de se lhe reconhecer.

Volumes das Camadas do Cerebelo

Os resultados quantitativos apresentados, não só os agora em discussão relativos aos volumes das camadas do cerebelo mas todos os outros a analisar adiante, foram determinados tendo em vista comparações entre grupos de animais alcooli-

zados e de animais testemunha. Nesta perspectiva, compreende-se que os métodos morfométricos utilizados fossem muitas das vezes os mais simples, nem sempre os mais completos, e que a não obtenção de valores reais absolutos não fosse considerada factor grandemente limitante. Deste modo, eventuais diferenças entre estes resultados e os de outros autores, referentes a quantificações de elementos do córtex cerebeloso, não são de hipervalorizar visto que é correntemente aceite serem estas determinações dependentes de múltiplos factores, entre os quais se realçam os inerentes às espécies de animais utilizados, às técnicas seguidas na preparação histológica dos tecidos e ainda ao tipo de análise quantitativa realizada.

A quantificação do volume das camadas do cerebelo dos animais alcoolizados e a dos respectivos controlos evidenciou a redução marcada, após 6 meses de alcoolização, dos volumes das camadas corticais (com excepção do da camada das células de Purkinje) e ainda do da substância branca. Resultados que a simples observação qualitativa dos cortes seriados dos cerebelos dos animais alcoolizados já deixava prever. A redução volumétrica mais precocemente encontrada foi a da camada granular, a única evidenciável aos 3 meses, no estudo dos cortes de parafina. A partir dos 6 meses de alcoolização as reduções volumétricas tornavam-se mais acentuadas, atingindo as camadas molecular, granular e a substância branca. Exceptua-se a camada das células de Purkinje cujo volume nunca apresentou variações significativas. O pequeno volume desta camada por um lado, e as dificuldades inerentes à sua correcta determinação pelo outro, deixam perceber que só grandes variações globais ao longo de toda a sua extensão possam levar ao aparecimento de diferenças volumétricas com significado estatístico. No presente trabalho não se entrou em consideração com as diferenças de tamanho das células de Purkinje que se sabe existirem nas diferentes partes do córtex cerebeloso (161). Com efeito, o volume desta camada foi calculado de igual modo em todos os grupos, partindo-se de valores médios da altura destas células obtidos em todos os lóbulos cerebelosos. Também a utilização simultânea do parâmetro comprimento total da camada das células de Purkinje con-

tribui para esbater as diferenças regionais eventualmente existentes.

As reduções volumétricas encontradas nas camadas granular e molecular estão provavelmente relacionadas, no primeiro caso com a marcada perda de células granulares observada após 6 meses de alcoolização e quanto ao segundo, quer com a diminuição do número dos seus neurónios, quer com a redução acentuada da trama dendrítica.

Registe-se ainda, após 6 meses de alcoolização, a redução marcada do volume da substância branca do cerebello, na qual se incluíram por facilidade técnica e como oportunamente já se indicou, os núcleos centrais. Idênticas avaliações efectuadas em animais submetidos a má-nutrição durante o período de desenvolvimento mostram que esta parte do cerebello sofre redução marcada que se mantém no animal adulto (110). Também no caso presente, como no anterior, esta redução pouco deverá contribuir para a diminuição volumétrica global do cerebello dado que é pequena a fracção ocupada pela substância branca em relação à restante massa cortical (110).

Foi reduzido o número de cerebelos analisados volumetricamente em cada período de experiência. Seria importante factor a ter em conta na valorização dos resultados a pequenez da amostra, se a análise do córtex cerebeloso se baseasse prioritária e exclusivamente neste parâmetro. Tal não acontece, porém. Mais, analisando o modo como as determinações volumétricas foram efectuadas, utilizando-se exclusivamente montagens de cortes de cerebello que apresentassem boas condições de estudo e recorrendo-se a análises estatísticas adequadas, estes valores que poderiam ser considerados meramente sugestivos, não deixam, no entanto, de constituir importantes dados para a avaliação global dos elementos do circuito cerebeloso, após o seu cotejo com outros obtidos sectorialmente em amostras suficientemente grandes e utilizando diferentes métodos. Aliás, a observação e a análise qualitativa de outros cerebelos cortados e montados em série, mas não

quantificados, apoia e reforça a evidência de marcadas reduções volumétricas nos grupos de animais alcoolizados.

Embora neste estudo não se tivesse entrado em linha de conta com os valores da retracção dos cerebelos e, como se disse, os volumes obtidos serem os referentes a 1/2 órgão, os valores encontrados nos cerebelos dos controlos podem ser considerados aproximados aos apresentados por Hillman e Chen (110), obtidos em maior número de animais. O facto confere ainda maior credibilidade e segurança às determinações volumétricas em apreço.

Torna-se hoje evidente que certos parâmetros estereológicos, especialmente os valores das densidades numéricas celulares, não podem ser completamente valorizados sem a informação adicional do volume do tecido onde essas determinações foram efectuadas (61, 62). Um dos maiores obstáculos à correcta interpretação das densidades celulares tem sido o desconhecimento dos volumes das zonas ou dos órgãos analisados. Muitas das vezes esses volumes não são de fácil determinação, nomeadamente no sistema nervoso central, onde ocorrem grandes variações dependentes do tratamento histológico do tecido (126, 241) e da idade dos animais (261). Estes factores estão na base das marcadas discrepâncias muito frequentemente encontradas na quantificação da mesma estrutura em diferentes estudos. As diferenças agravam-se quando em vez de determinações volumétricas globais do órgão se tentam analisar os volumes das suas diferentes partes. Afortunadamente, este factor condicionante não se aplica ao cerebelo, onde é possível a identificação e individualização de todas as suas camadas, o que permite determinações volumétricas bastante precisas.

Todavia, para comparação de resultados volumétricos tem que se utilizar ratos da mesma estirpe, visto que se descreveram variações do tamanho do cerebelo e dos padrões de lobulação e fissuração do verme cerebeloso entre diferentes estirpes de ratos (106, 118). Há ainda que ter em conta as diferenças morfométricas acentuadas na camada granular do verme destes animais (106, 128).

No presente trabalho foi impossível colher informação precisa sobre a estirpe dos ratos utilizados. Porém, a observação cuidada durante o processo de determinação volumétrica da organização macroscópica dos cortes seriados obtidos do verme destes cerebelos, leva a supor tratar-se de ratos da estirpe Sprague-Dawley. Com efeito, e de acordo com as descrições de Heinsen e Heinsen (106), o padrão de fissuração observado nos lóbulos do lobo cerebeloso posterior (IX e X), a presença sistemática de um sulco na parte basal do lóbulo X e a subdivisão do lóbulo IX são típicos do cerebelo do Sprague-Dawley (106).

A determinação do peso do cerebelo, convenientemente isolado, poderia ter sido utilizado como um método simples, embora grosseiro, para detectar diferenças volumétricas globais entre os cerebelos dos animais alcoolizados e os dos respectivos controlos. Neste estudo, não se recorreu a este método, já que são grandes as variações individuais dos pesos dos cerebelos dos animais alcoolizados e dos controlos e não se encontraram diferenças significativas, ao fim de 12 e 18 meses de alcoolização.

Poder-se-ia ainda avaliar as alterações volumétricas existentes entre as diferentes camadas corticais nos animais alcoolizados e respectivos controlos, quer nos cortes de parafina, quer nos cortes semifinos (onde se determinaram as densidades numéricas celulares), pela medida da espessura das diferentes camadas e utilizar este valor como índice volumétrico (61, 166, 185) evitando-se, deste modo, as complexas determinações volumétricas praticadas. Não se utilizou este método, bem mais simples e menos moroso do que o escolhido, por não se adaptar à organização estrutural do córtex cerebeloso cuja superfície é muito irregular, e por isso, pouco adequado a análises de parâmetros lineares como seja a espessura das camadas do cerebelo.

O emprego do método de determinação volumétrica baseado nas médias das áreas obtidas a partir de cortes separados por uma distância necessariamente conhecida, já utilizado por outros autores, em diferentes circunstâncias

experimentais (261, 282) pareceu ser o mais indicado neste tipo de estudo. Com efeito, permite a obtenção de valores precisos, atendendo a que é possível variar a distância entre os cortes em função das modificações mais ou menos bruscas da sua configuração e ainda ao facto de que os planos de corte utilizados podem ser efectuados perpendicularmente ao eixo longitudinal da região a estudar.

A determinação dos volumes parcelares das camadas do cerebelo, serviu ainda como referência para a quantificação das estruturas nelas compreendidas e assim avaliar de modo global as suas alterações que, analisadas através do seu número por unidade de volume, não poderiam ser tão pormenorizadamente valorizadas.

Número de Células do Córtex Cerebeloso

Como atrás se referiu, os resultados obtidos não representam valores reais absolutos; não são, por isso, passíveis de comparação com dados quantitativos referentes a números de células do córtex cerebeloso encontrados por outros autores, em circunstâncias normais, patológicas ou experimentais (110, 177, 178, 274).

Para esbater os factores limitantes de que enfermam os estudos quantitativos desta índole, colheram-se sempre os fragmentos nos mesmos lóbulos cerebelosos, tratou-se de modo idêntico o material e aplicaram-se ainda sistematicamente os mesmos métodos de quantificação, tornando assim possível a comparação das densidades numéricas das células do córtex cerebeloso com razoável margem de segurança. Quando, em vez de densidades numéricas, se passa a lidar com números totais, é-se obrigado a considerar dados volumétricos de referência que, no caso presente, já foram devidamente criticados. Com efeito, nestas circunstâncias tem que se atender ainda, entre outros factores condicionantes, ao tipo de inclusão utilizado para se poderem valorizar cor-

rectamente as observações feitas em Epon e parafina que induzem graus de retracção tecidual diferente (110, 126), com repercussões de monta no tecido a observar (126, 241). Neste estudo, não se procedeu a qualquer correcção referente às diferenças de retracção entre o material incluído em Epon e utilizado para o cálculo das densidades numéricas, e o incluído em parafina, que serviu de base para a determinação dos volumes e subsequente cálculo do número total de células. Ainda no que respeita a números totais tem que se ter em linha de conta (como já foi amplamente discutido), a existência de diferenças citoarquitectónicas regionais do cerebelo (106, 107, 128, 161), e as suas implicações na avaliação das densidades numéricas dos diferentes tipos celulares.

A análise quantitativa efectuada diz respeito exclusivamente a neurónios com núcleo visível não se tendo contado os restantes. Como no sistema nervoso e, em particular, no córtex do cerebelo o número de células binucleadas é insignificante, a probabilidade de erro por hiperestimação de valores é reduzido (126).

Não se encontraram diferenças significativas nos diâmetros médios dos núcleos utilizados como elementos de identificação e quantificação de cada tipo celular entre os grupos de animais alcoolizados e controlos em cada período da experiência. No entanto, nos cálculos da densidade numérica, utilizou-se o diâmetro médio de cada tipo celular em cada grupo e não o valor médio obtido a partir da globalidade dos grupos alcoolizados e controlos porque, flutuações deste valor, mesmo não significativas, causam grandes alterações nos valores das densidades numéricas. Teve-se ainda em consideração que pequenas variações de uma grandeza, como o diâmetro nuclear dos neurónios, podem traduzir alterações metabólicas como as provocadas pelo álcool (69, 120, 255, 256). Já as mesmas reservas e consequentes cuidados se não aplicam a factores de compensação, como é o caso do menor valor nuclear encontrado. Aqui, os resultados foram obtidos a partir da globalidade da amostra, dado que as alterações eventualmente existentes neste parâmetro já não dependerão de factores biológicos como os anteriores, mas sim do plano da secção.

Não foram valorizadas as diferenças das densidades numéricas encontradas entre os diferentes grupos experimentais e os grupos testemunha por poderem depender de inúmeros factores, desde pequenas diferenças existentes no tratamento dos fragmentos estudados até às condições de impregnação e coloração do material que influenciam marcadamente a possibilidade de identificação dos diferentes tipos celulares.

Os resultados obtidos na análise quantitativa dos neurónios do córtex do cerebelo dos grupos de animais alcoolizados e dos respectivos grupos de controlo não mostraram diferenças significativas nas densidades numéricas nem nos números totais de células, após 1 e 3 meses de experiência.

Após 6 meses de alcoolização, tornou-se notório que as células de Purkinje e as células de Golgi se comportavam de modo diverso do dos outros tipos celulares do córtex cerebeloso, nos animais alcoolizados. A densidade numérica das células de Purkinje não apresentava diferenças significativas ao longo da experiência e só aos 18 meses de alcoolização o seu número total se encontrava significativamente reduzido. A densidade numérica das células de Golgi, aos 18 meses de experiência, era até maior nos animais alcoolizados, provavelmente em consequência da maior «concentração» destas células num menor volume da camada granular, hipótese reforçada pela inexistência de diferenças significativas do seu número total ao fim do mesmo período. Esta aparente discrepância é bem o exemplo dos cuidados que se deve ter, e a que se tem vindo a dar o devido relevo, na avaliação de parâmetros estereológicos analisados sem conhecimento de volumes de referência.

Os resultados respeitantes ao número de células de Purkinje são diferentes dos apresentados noutros trabalhos em que se analisam os efeitos da alcoolização crónica nesta população celular e que apontam para uma diminuição mais marcada do número destas células, após períodos longos de consumo. Porém, chama-se a atenção para o facto de naqueles trabalhos (266, 272, 274), os valores apresentados serem do seu número por unidade de superfície. Este parâmetro é pouco informativo, sendo frequente encontrarem-se valo-

res significativamente diferentes, posteriormente reconhecidos como incorrectos quando se passa à análise por unidade de volume. No que respeita às células de Purkinje esta crítica torna-se pertinente depois de Heinsen e Heinsen (107) terem demonstrado, no Rato normal, alterações numéricas destas células por unidade de superfície não havendo, no entanto, marcadas diferenças em termos de números totais de células se se exceptuar o lóbulo VI b + c (107). No entanto, os já mencionados trabalhos de Hillman e Chen (110, 111) realizados em cerebelos inteiros e com correcção do efeito da retracção, apresentam valores muito semelhantes aos encontrados nesta investigação.

Em contraste com estes resultados, após 6 meses de alcoolização, encontraram-se profundas alterações numéricas nas restantes populações celulares do córtex cerebeloso. As mais marcadas, evidenciadas até qualitativamente em cortes semifinos, foram as das células granulares. Após o período de alcoolização referido, viam-se na camada granular extensas zonas empobrecidas de células granulares, aspecto que se acentuava com o decurso da alcoolização. Quantitativamente, verificou-se que a densidade numérica e o número total destes neurónios diminuía significativa e progressivamente após 6 meses de consumo de álcool. Aliás, os valores encontrados neste trabalho são idênticos a outros já anteriormente publicados em trabalhos desta linha de investigação (246) mas utilizando material fixado por imersão; o número de interneurónios da camada molecular foi avaliado quer no seu conjunto, quer analisando separadamente as células do seu 1/3 profundo (onde predominam as células em cesto) e as do 1/3 superficial (quase todas células estreladas). Não se estudaram, neste trabalho, as células estreladas do 1/3 médio da camada molecular porque representam uma população celular de transição entre os dois tipos anteriores (179, 191, 194) e, como tal, de difícil avaliação quantitativa. A densidade numérica do conjunto dos interneurónios da camada molecular não diferia significativamente nos grupos de animais alcoolizados e nos contolos, em todos os períodos

experimentais. Também não se encontraram variações em relação à das células estreladas do 1/3 superficial. Porém, nas células em cesto, registou-se marcada diminuição da densidade numérica aos 12 e 18 meses de alcoolização. Todavia, dada a acentuada redução volumétrica da camada molecular já apontada e analisando estes resultados de maneira global, verificou-se que o número total dos interneurónios da camada molecular e isoladamente, o das células em cesto e estreladas, se encontrava francamente reduzido.

As diferenças encontradas entre os dois tipos de interneurónios, após a administração prolongada de álcool, são difíceis de explicar dado que se desconhecem referências quanto a diferenças de comportamento destes tipos celulares na presença do tóxico bem como, de variações numéricas em circunstâncias experimentais. Poder-se-ia admitir que o comportamento diverso destes interneurónios, que afinal se sabe terem origem embriológica idêntica (191), funções similares no circuito cerebeloso (72, 119) e até o mesmo tipo de transmissor químico (41, 220), estaria em relação com as marcadas alterações encontradas no padrão da deposição de lipofuscina que é muito mais precoce e abundante nas células em cesto, sendo escassa e por vezes inexistente nas células estreladas do 1/3 superficial (251). Porém, o envolvimento da lipofuscina na biologia neuronal está longe de esclarecida, razão pela qual esta hipótese patogénica deve ser encarada com reserva.

Embora as células epiteliais de Golgi não sejam elementos integrantes do circuito cerebeloso, estão com ele muito relacionadas, quanto mais não seja, porque os seus prolongamentos constituem o suporte glial da camada molecular. Encontraram-se algumas variações numéricas destas células ao longo dos diferentes períodos experimentais, provavelmente dependentes de condicionalismos de amostragem, motivo pelo qual se não fazem considerações a este propósito. Todavia, registou-se que estes factos contrastam com o observado em situações patológicas onde se encontra marcado aumento do número de elementos desta população celular (178).

O número de neurónios numa dada região do sistema nervoso é um índice fiel da sua capacidade funcional. Este facto confere a maior relevância à comparação do número de células no córtex cerebeloso dos animais alcoolizados com o dos controlos respectivos. Ficou patente a redução do número de neurónios no decurso da alcoolização, o que deve ser encarado como factor importante da diminuição da capacidade funcional do córtex cerebeloso.

Aferências Corticais Cerebelosas — Terminais das Fibras Trepadoras e Musgosas

O estudo dos efeitos da administração crónica de álcool sobre o circuito cerebeloso obrigou à análise quantitativa das principais aferências corticais — as fibras trepadoras e as musgosas.

A observação qualitativa dos terminais das fibras trepadoras, no 1/3 profundo da camada molecular, não mostrou alterações até aos 12 meses de experiência. Decorrido este período, os terminais que circundavam os grandes troncos dendríticos das células de Purkinje dos animais alcoolizados pareciam aumentar de número e dimensões, encontrando-se em muitos deles grande densidade de vesículas sinápticas e aumento do número de microtúbulos.

Como referiu Sotelo (231), é impossível determinar-se o número absoluto de terminais das fibras trepadoras sem a aplicação de métodos quantitativos elaborados, difíceis de pôr em prática com a tecnologia disponível. Por isso mesmo, procedeu-se ao cálculo da densidade volumétrica dos referidos terminais no neurópilo que circunda os troncos principais das células de Purkinje, obtendo-se a fracção do volume por eles ocupado nessa área. Verificou-se, após 12 meses de alcoolização, aumento significativo da densidade volumétrica destes terminais. Este facto pode resultar, quer do aumento das dimensões dos terminais das fibras trepadoras, quer do aumento do seu número, ou ainda destes dois factores simultaneamente. Em qualquer dos casos é evidente a marcada actividade plástica destes elementos. Na base desta actividade

regenerativa poderão estar dois factores aliás complementares: por um lado, o «sprouting» axonal pode estar relacionado com a degenerescência de outras fibras trepadoras após acção do álcool sobre os pericários correspondentes — sabe-se que, em situações de administração aguda, o etanol inibe a actividade das células do complexo olivar (225, 226) — pelo outro lado, pode ser consequência da redução do número das fibras paralelas demonstrado após 12 meses de alcoolização. Em qualquer dos casos, seria mantida a superfície activa total das células de Purkinje à semelhança do que se verifica noutras situações (109, 112, 231).

Embora se não tenham observado terminais degenerados de fibras trepadoras, dá consistência à primeira destas hipóteses a presença, nos grandes troncos dendríticos das células de Purkinje, de espinhas dendríticas com sinais francos de deaferenciação (14, 87, 229, 231). Este processo desenvolver-se-ia lentamente, o que explicaria a inexistência de outros achados, frequentes em situações de deaferenciação de instalação brusca (14, 29, 68, 87, 237). Abona a segunda hipótese a presença, nos animais alcoolizados durante 12 e 18 meses, de terminais de fibras trepadoras no 1/3 superficial da camada molecular, estabelecendo sinapses com espinhas dendríticas dos ramos periféricos das células de Purkinje. Situação idêntica a esta foi assinalada por Sotelo (231, 235) no cerebelo agranular de mutantes.

Ao contrário do que acontece com o sistema das fibras trepadoras não se observaram ao longo de toda a experiência, na camada granular dos animais alcoolizados, alterações qualitativas na morfologia dos terminais das fibras musgosas.

São grandes as dificuldades de quantificação destes terminais dada a variabilidade da sua forma e do número de varicosidades que possuem. Por isso, se recorreu à determinação da densidade volumétrica destes terminais em relação ao glómulo cerebeloso, não se encontrando diferenças significativas ao longo da experiência.

Após 12 meses de alcoolização, encontraram-se terminais de fibras musgosas no 1/3 profundo da camada molecular,

achado normal no córtex cerebeloso do Coelho onde estabelecem sinapses com células granulares ectópicas (238). Foram também observados ao mesmo nível, se bem que raramente, no córtex cerebeloso do Rato normal, sinaptizando com células granulares (38). Em circunstâncias experimentais, descreveram-se arranjos semelhantes no Ratinho (192) e no Furão (143). Desconhece-se o papel funcional desempenhado por estes terminais na camada molecular do córtex cerebeloso do Rato alcoolizado. Poderá, no entanto, estar relacionado com a plasticidade destas fibras (11, 143, 231, 287) na procura de alvos pós-sinápticos que assegurem a manutenção da sua superfície activa, inclusivé com estruturas da camada molecular.

As alterações morfológicas encontradas nos terminais das fibras aferentes do córtex cerebeloso dos animais alcoolizados, mostram claramente que, tal como acontece noutras situações (14, 87), a especificidade sináptica dos seus terminais só ocorre quando os dois sistemas aferentes estão íntegros. Havendo alterações num deles (11, 14, 87, 192, 229, 231, 235, 237), regra geral surgem modificações plásticas no outro tendentes a minimizá-las, nomeadamente tentando compensar a perda de zonas activas, mesmo com prejuízo da especificidade dos contactos sinápticos.

Células Granulares

As células granulares além de constituírem uma população neuronal com características peculiares, são particularmente sensíveis: sobressai a frequência com que são selectivamente afectadas em condições experimentais ou patológicas, quer durante a histogénese, quer no decurso da vida adulta (108, 117, 131, 187, 192, 231, 235). O álcool provoca alterações marcadas nestas células (19, 164, 266, 274). Assim, após 6 meses de alcoolização, encontrou-se degenerescência neuronal de tipo denso, com forte componente glial reactivo, a par de outros aspectos degenerativos de tipo granulo-vacuolar.

O aparecimento destas últimas alterações, características das situações de senescência neuronal (16, 156, 183), nos animais alcoolizados jovens, além de outros factos, sugerem que o consumo crónico de álcool poderá ser um factor de precoce envelhecimento neuronal (55, 85, 86, 173).

Não está ainda esclarecido o mecanismo subjacente às alterações degenerativas neuronais e à morte celular após longos períodos de alcoolização. É provável que desempenhe papel importante a alteração dos processos de síntese proteica neuronal descrita por Tewari e Noble (255, 256) nestas circunstâncias.

Já após os 3 meses de alcoolização, e a preceder as alterações pericáricas descritas, observaram-se, dispersos no neurópilo da camada granular, perfis dendríticos destas mesmas células com sinais evidentes de degenerescência também de tipo denso. Devem ser interpretados como degenerescência dendrítica primária idêntica à descrita noutras situações experimentais (17) e patológicas (175, 176) e independentes de fenómenos de degenerescência transináptica (10, 89, 95), uma vez que não se observaram alterações nos terminais das fibras musgosas com as quais estes dendritos fazem sinapse. Esta degenerescência dendrítica é provavelmente precoce e dependente de alterações metabólicas ocorridas nos pericários que se manifestam pelas lesões descritas nas porções mais periféricas destes neurónios, provavelmente por interferência com os mecanismos de transporte neuronal (70, 94, 222). Levam, por si só, a marcadas modificações nas conexões neuronais por diminuição do tecido pós-sináptico.

Tendo em vista aprofundar o estudo destas alterações recorreu-se ao método de Golgi, por permitir delinear com clareza, a forma, o arranjo espacial e as particularidades mais finas das células nervosas e dos seus prolongamentos. A utilização deste método em situações experimentais e patológicas possibilita a detecção de alterações não tão seguramente demonstráveis por outros métodos de estudo, por facultar a observação da resposta neuronal na sua globalidade e individualidade (219).

Sabe-se, porém, que é um método com limitações. Assim, só uma fracção diminuta de neurónios, até 10% (219, 260), são impregnados, registando-se variações neste número dependentes de múltiplos factores, muitos ainda desconhecidos e, por isso, não controláveis (260). Não é um método selectivo, por não se poder induzir a impregnação de um tipo particular de célula, nem tão pouco se pode afirmar estarem as células impregnadas na sua totalidade (260). No entanto, a sistemática comparação com o material dos grupos de controlo tratado de modo idêntico, o estudo ultrastructural efectuado em paralelo e ainda a utilização combinada dos dois métodos, método de Golgi-ultraestrutura (74), dão credibilidade às observações, qualitativas e quantitativas, a que se procedeu com esta técnica. Atenuaram-se, assim, os inconvenientes da sua utilização e pode tirar-se o melhor proveito das suas reais vantagens.

A aplicação de métodos quantitativos a neurónios impregnados pela prata é extremamente útil para avaliar parâmetros que a simples observação qualitativa não permite muitas vezes valorizar. Refira-se, todavia, que a quantificação de material tratado pelo método de Golgi implica escolha muito criteriosa das estruturas a analisar, não se devendo considerar, pelas razões atrás expostas, as marcadamente afastadas dos padrões normais.

No estudo quantitativo das células granulares impregnadas com este método deu-se relevo ao estudo dos dendritos, particularmente às ramificações digitiformes. Estudou-se ainda a densidade da árvore dendrítica com o método dos círculos concêntricos. A nível dos axónios, também estudados, prestou-se particular atenção ao número de varicosidades dos seus segmentos ascendente e transversal (fibras paralelas).

O número de ramificações digitiformes dos dendritos das células granulares encontrava-se reduzido nos grupos submetidos a 1 e 3 meses de alcoolização, em consequência da degenerescência dendrítica. Os resultados obtidos com o método de Sholl (223) confirmam os dados acima referidos; após 1 e 3 meses de alcoolização observou-se diminuição do número de intersecções dos ramos dendríticos com os cír-

culos concêntricos nas partes periférica e média do campo dendrítico, áreas onde se distribui a maioria das ramificações digitiformes das células granulares. Neste estudo da arborização dendrítica não se introduziram correções inerentes ao seu estudo bidimensional. Outros autores, em circunstâncias idênticas (63, 67), referem que o número total de intersecções com ramos dendríticos é semelhante, quer a análise neuronal se processe a 2, quer a 3 dimensões. Pelo contrário, decorridos 6 meses já não se encontraram diferenças significativas deste parâmetro entre os animais alcoolizados e os respectivos animais de controlo.

Estas diferenças podem atribuir-se a 2 factores: por um lado, a maior resistência, das células mais lesadas, à impregnação o que dará em resultado, só aparecem impregnadas aos 6 meses as células não atingidas; por outro lado, a possibilidade da ocorrência de fenómenos de regeneração dendrítica apesar da acção do álcool decorridos 6 meses de experiência. Contra esta hipótese, todavia, encontra-se o facto da densidade volumétrica das ramificações digitiformes das células granulares, que participam na formação do glomérulo cerebeloso estar, como adiante se verá, francamente reduzida aos 6 meses de alcoolização. Saliente-se no entanto que, do ponto de vista quantitativo, a amostra analisada com métodos ultraestruturais foi muito menos numerosa do que a trabalhada com o método de Golgi.

O estudo dos axónios impregnados pela prata mostrou-se também importante na avaliação da conectividade neuronal. Os estudos quantitativos relativos às varicosidades axonais, mostraram não haver diferenças valorizáveis entre os grupos alcoolizados e correspondentes grupos de controlo. Prestou-se particular atenção a este parâmetro dado que, quer a porção ascendente, quer a transversal dos axónios das células granulares formam numerosas sinapses com as células de Purkinje, atribuindo-se funções distintas a cada uma delas. A porção ascendente, dada a sua organização espacial relativamente aos dendritos das células de Purkinje,

formaria o principal sistema excitatório desta célula (27, 142), enquanto as fibras paralelas teriam mais uma função moduladora (142).

As células granulares do córtex cerebeloso do Rato adulto são altamente lesadas, pelo consumo crónico de álcool. O facto de se saber que o nível de despolarização das células de Purkinje está mais relacionado com a actividade de grupos de células granulares subjacentes àquelas do que exclusivamente com a distribuição das fibras paralelas que cruzam as suas árvores (142), como durante muitos anos se pensou, confere à perda celular e ao padrão focal de degenerescência das células granulares importância ainda maior, uma vez que a activação das células de Purkinje se encontrará mais dificultada nessas áreas, ainda que atravessadas por número elevado de fibras paralelas.

Organização Estrutural do Neurópilo da Camada Granular (Glomérulo Cerebeloso)

Está demonstrado que a maior parte das operações de transmissão da informação entre neurónios se realiza no neurópilo, e que da sua integridade morfológica depende o normal funcionamento dos circuitos neuronais (145). Assim, a análise do neurópilo do córtex cerebeloso é indispensável para correcta avaliação dos efeitos do álcool no circuito neuronal do cerebello.

Na camada granular, escolheu-se o glomérulo cerebeloso para estudar eventuais alterações. Apesar de ser uma área de estrutura muito complexa, os seus elementos são bem identificáveis (72, 97, 119, 168), o que permite a avaliação pormenorizada de cada um deles, mesmo em situações em que a organização normal se encontre modificada (100, 231, 234, 235). Tais elementos são, assim, susceptíveis de quantificação criteriosa, mesmo nessas circunstâncias. Para além disso, o seu papel funcional no circuito cerebeloso encontra-

-se bem definido, ao contrário do que se verifica com a maioria das outras áreas de neurópilo do sistema nervoso.

Os resultados obtidos mostraram que a organização morfológica dos glomérulos cerebelosos apresentava profundas alterações após alcoolização crónica, e ainda, que estas dependiam do tempo de consumo de álcool.

Após 3 meses de alcoolização visualizavam-se, como já foi referido, dispersos na camada granular, perfis dendríticos degenerados de células granulares, alguns estabelecendo ainda contactos sinápticos com os perfis das fibras musgosas. Porém, não havia alteração da organização global dos glomérulos cerebelosos. Após 6 meses de alcoolização, estes aspectos degenerativos acentuavam-se de modo marcado, apresentando-se muitos dos terminais das fibras musgosas, circundados por múltiplos perfis dendríticos com sinais francos de degenerescência. Estas alterações encontram-se, provavelmente relacionadas de modo directo com a morte das células granulares que se verifica, como se disse, após os 6 meses de consumo de álcool. A perda destes elementos pós-sinápticos, traduz-se na diminuição da sua densidade volumétrica e leva a acentuado empobrecimento dos glomérulos cerebelosos.

Decorridos 12 meses de experiência, passou a observar-se, nos animais alcoolizados, outro tipo de organização glomerular bem diferente da referida; os terminais das fibras musgosas encontravam-se envolvidos por dendritos de células de Golgi que com eles estabeleciam múltiplos contactos sinápticos assimétricos (96, 258) sendo frequentes as sinapses «en marron» (43, 168). Deve sublinhar-se que a participação dos dendritos das células de Golgi na organização sináptica do glomérulo cerebeloso normal é controversa (72, 101, 168). Todavia, arranjos glomerulares semelhantes a estes, onde predominam os dendritos de células de Golgi como estrutura pós-sináptica, foram descritos noutras circunstâncias experimentais (24, 231, 234, 235), que apresentam como denominador comum, ausência ou pelo menos diminuição do número de células granulares.

Torna-se pois evidente que, faltando os componentes pós-sinápticos habituais das fibras musgosas — os dendritos

das células granulares — o glomérulo cerebeloso se reorganiza, utilizando os dendritos disponíveis, neste caso os das células de Golgi.

Esta reorganização glomerular, feita à custa de novas sinapses com os dendritos das células de Golgi explica que, nos animais alcoolizados, o número de perfis sinápticos em cada secção glomerular se mantenha praticamente inalterada apesar da marcada redução das sinapses entre os terminais musgosos e os dendritos das células granulares.

A obtenção de parâmetros estereológicos para as sinapses glomerulares, tal como a sua densidade numérica, de inegável valor para o estudo presente, são extremamente difíceis de conseguir dada a existência de populações sinápticas com formas e curvaturas muito diversas. Deve anotar-se ainda a presença de numerosas soluções de continuidade nos espessamentos dos contactos sinápticos com os dendritos das células de Golgi. Os métodos de determinação da densidade numérica que se baseiam na forma das sinapses (149, 262) foram desde logo, por todas estas razões, excluídos. Os que permitiriam a obtenção de densidades numéricas sem considerar a forma, a dimensão, ou orientação das sinapses (59, 239, 262), requereriam a obtenção de grande número de cortes seriados o que, dada a grandeza da amostra, era impraticável, opinião, aliás, perfilhada por outros autores defrontados com idêntico problema (159, 160).

Apesar dos condicionalismos expostos referentes à quantificação sináptica nesta situação, os valores encontrados traduzem, ou aumento real do número de contactos sinápticos ou aumento da sua extensão. Em qualquer dos casos é possível concluir que houve sinaptogénese reactiva (46, 53, 113, 240), com formação de novos contactos de área substancialmente maior do que a encontrada nos glomérulos normais, os quais, como se disse, teriam surgido como mecanismo compensador da diminuição da área sináptica registada nos períodos iniciais da experiência.

Esta reorganização, afinal idêntica à que se verifica noutras circunstâncias experimentais (24, 192, 231, 234, 235), traduz as potencialidades plásticas dos processos neuronais (dendritos e axónios) do córtex cerebeloso do Rato adulto,

mesmo ainda sob o efeito do álcool. Saliente-se, todavia, que as sinapses neo-formadas não restabelecem a estrutura normal do glomérulo cerebeloso, uma vez que não é mantida a proporção de sinapses entre os terminais das fibras musgosas e os dendritos das células granulares e entre os terminais das fibras musgosas e os dendritos das células de Golgi.

Apenas baseados em dados anatómicos pouco se pode concluir acerca das potencialidades funcionais destes glomérulos remodelados. No entanto, as alterações do número e da proporção entre os diferentes tipos de sinapses existentes nestes glomérulos, levam a pensar que, por um lado, os glomérulos cerebelosos dos animais alcoolizados têm provavelmente menor capacidade de mediar impulsos excitatórios devido à diminuição do número de sinapses entre as fibras musgosas e as células granulares e por outro, que poderá haver até aumento da actividade inibitória no circuito cerebeloso dado o acréscimo das sinapses entre os terminais das fibras musgosas e as células de Golgi. Em qualquer dos casos, o resultado final traduzir-se-à num desequilíbrio marcado entre as vertentes excitatória e inibitória do circuito cerebeloso, com predominância desta última.

Árvores Dendríticas das Células de Purkinje

É relevante o estudo da organização dendrítica das células de Purkinje após consumo crónico de álcool em comparação com a dos respectivos animais testemunha. Isto por vários motivos: ser esta célula altamente sensível a esta substância neurotóxica (76, 182, 201, 204, 224, 245, 248, 249), tratar-se de um elemento de primordial importância no circuito cerebeloso (72, 119, 168, 194) e, ainda, pelo facto de as arborizações dendríticas, tão exuberantes nestes neuró-

nios, desempenharem papel fulcral no processamento das suas operações (72, 119, 168).

Os resultados obtidos, idênticos aos observados por outros autores no Ratinho (201, 275), caracterizam-se por diminuição progressiva da área ocupada pelas arborizações dendríticas das células de Purkinje, após 6 meses de consumo de álcool. Observou-se diminuição do comprimento dendrítico por unidade de área dendrítica e do comprimento dendrítico total, provavelmente devido à diminuição do número total de ramos dendríticos, nomeadamente os mais periféricos (ordem 1 e 2). Este empobrecimento é confirmado pelas observações ultraestruturais do neurópilo da camada molecular, onde se localizam os ramos dendríticos periféricos e suas espinhas com sinais de degenerescência do tipo denso.

Deve sublinhar-se que, no estudo quantitativo efectuado, só se entrou em linha de conta com árvores bem impregnadas, desprezando-se todas aquelas em que havia dúvidas quanto à qualidade da impregnação. Do mesmo modo, não se aproveitaram as que mostravam marcadas alterações morfológicas ou disposição espacial invulgar do campo dendrítico. Se bem que deste modo se tenha imposto grande limitação à amostra a quantificar, o critério seguido torna, sem dúvida, os resultados mais dignos de confiança.

A análise quantitativa utilizada é uma das várias que permitem a avaliação bidimensional do padrão de arborizações dendríticas (22, 259, 280). Outras, muito mais complexas, poderiam ter sido aplicadas (21, 22, 212, 227, 263); no entanto, parâmetros tão diversos como a frequência média de segmentos dendríticos, o comprimento médio de ramos e segmentos, a frequência de tipos topológicos, os graus de probabilidade de ramificação muito usados no estudo da dendrogénese (21), são de difícil determinação sem o recurso a meios computadorizados. Saliente-se que, a informação adicional que adviria da sua aplicação a árvores dendríticas completamente desenvolvidas pouco acrescentaria aos dados obtidos.

Várias objecções podem levantar-se ao sistema de ordenação utilizado. A técnica aplicada obriga a condicionalismos numéricos demasiadamente rígidos na ordenação dos ramos dendríticos, impossibilitando a ordenação de arborizações em que os ramos dendríticos distais faltem ou estejam incompletos (22, 227, 259). Note-se, todavia, que esta crítica aplica-se a qualquer método de ordenação, somatofugal ou somatopetal (22, 259), visto que a análise correcta de uma árvore, não permite entrar em linha de conta com segmentos perdidos. Outros condicionalismos seriam de atender, como a variabilidade do tipo de impregnação, o poder de resolução do microscópio e ainda os artefactos inerentes ao estudo bidimensional das arborizações dendríticas (22). No entanto, este método tem-se mostrado valioso no estudo de árvores dendríticas complexas e extensas como as das células de Purkinje. Nestas arborizações e em particular no animal adulto, este tipo de ordenação tem vantagens tais como, não depender das características métricas ou topológicas do padrão de ramificação da árvore dendrítica e por isso, ser adequado ao estudo de campos dendríticos extensos nos quais os números de ordem não aumentam tanto quanto o número de segmentos (22, 259).

No caso presente, o sistema de ordenação utilizado, combinado com as técnicas de intersecções por linhas (189, 280) possibilitou o estudo comparativo de parâmetros dendríticos cuja análise permitiu concluir pela diminuição acentuada da área receptora das arborizações.

O número de espinhas dendríticas, dado o papel que desempenham na transferência sináptica da informação neuronal, é também importante parâmetro na avaliação da capacidade receptora dos neurónios (57, 99, 242).

A quantificação das espinhas dendríticas das células de Purkinje é uma tarefa difícil dadas as características morfológicas destas estruturas (72, 168, 194). A contagem das espinhas, limitada às que se visualizam no mesmo plano de foco do ramo dendrítico estudado (50, 125, 189, 280), poderia originar uma subestimação do seu número (75). Porém, nas

células de Purkinje estudadas, estes condicionalismos não são de considerar: por um lado, a maior parte dos ramos terminais eram finos e, por outro, o tamanho das espinhas não se encontrava reduzido nos animais alcoolizados. Observou-se redução do número das espinhas dendríticas, após 6 meses de experiência que, contudo, era mais significativa e atingia a grande maioria das células, após os 12 meses. A perda destes elementos pós-sinápticos, também descrita em circunstâncias semelhantes no hipocampo do Ratinho (201, 202), deve estar intimamente ligada aos processos degenerativos observados na ultraestrutura da camada molecular. A degenerescência das espinhas dendríticas das células de Purkinje poderá ser de dois tipos, primária (17, 175, 176) ou transináptica (89, 95), em consequência da degenerescência acima referida das células granulares.

Poderia pensar-se que a diminuição do número de espinhas, observada nos animais alcoolizados, poderá dever-se a deficiências de impregnação, não só dependentes da deaferenciação (148) sofrida por degenerescência das células granulares, mas ainda, e de acordo com Riley e Walker (202) à possibilidade de a exposição prolongada ao álcool poder causar alterações químicas no tecido nervoso, tornando as espinhas dendríticas menos susceptíveis à impregnação pela prata. Os resultados apresentados poderiam, assim, estar hipervalorizados. No entanto, as alterações degenerativas dessas espinhas, observadas paralelamente a nível ultraestrutural, não deixa lugar a dúvidas quanto à redução do seu número.

A par da redução numérica das espinhas dendríticas nos animais alcoolizados, muitas das existentes nos ramos dendríticos distais passavam a apresentar padrão morfológico diferente do normal (72, 119, 168, 194), isto é, mais longas e mais finas. Estas modificações evidenciam as potencialidades plásticas do tecido dendrítico já amplamente demonstradas no cerebelo por outros autores (10, 28, 45, 46, 47, 109, 143, 192, 231, 235) à imagem do que acontece noutras áreas do sistema nervoso (23, 34, 35, 79, 113, 151, 218).

A desorganização da arborização dendrítica das células de Purkinje induzida pelo álcool, pode depender de alterações metabólicas verificadas nos corpos celulares as quais

se reflectiriam, primeiro nas partes mais periféricas das árvores dendríticas e só mais tarde levariam à degenerescência do pericário. Nesta perspectiva, apontam trabalhos anteriores que mostraram a frequência do aparecimento de corpos de inclusão nuclear nas células de Purkinje dos ratos alcoolizados (245), traduzindo prováveis alterações da síntese dos ácidos nucleicos (69, 255, 256) e ainda outras investigações, nas quais se evidenciaram marcadas alterações dos organelos citoplasmáticos; incluem-se nestas últimas a acumulação precoce e progressiva de lipofuscina (248, 251) e ainda a presença de alterações mitocondriais (249).

As alterações nucleares e citoplasmáticas induzidas pelo álcool nas células de Purkinje poderiam explicar, por si só, os processos degenerativos encontrados nas arborizações dendríticas. Acresce, porém, que se descreveram paralelamente alterações microtubulares nos grandes troncos dendríticos das células de Purkinje dos animais alcoolizados (174), observando-se uma diminuição muito severa do seu número bem como alteração da sua disposição habitual, modificações que influem marcadamente nos mecanismos de transporte neuronal (70, 94, 222).

Qualquer que seja o mecanismo patogenético destas alterações dendríticas, o seu resultado final é a diminuição acentuada da superfície receptora da árvore dendrítica da célula de Purkinje, de que resulta deficiente capacidade de recepção, integração e transmissão da informação destas células.

Organização Estrutural do Neurópilo da Camada Molecular

O estudo do neurópilo da camada molecular, após alcoolização crônica, mostrou um conjunto de alterações, dependentes do tempo de alcoolização, que levavam a modificações marcadas da sua organização estrutural, com compromisso dos padrões de normal conexão neuronal. Eram a princípio

de índole degenerativa, surgindo posteriormente sinais francos de reorganização plástica.

Após 3 meses de alcoolização, abundavam os prolongamentos celulares distróficos dispersos pela camada molecular, o que confere significado particular ao processo degenerativo. O seu aparecimento e posterior arranjo em estruturas mais complexas — as placas neuríticas — são indicadores morfológicos de envelhecimento neuronal. Com as outras alterações já referidas nas mesmas circunstâncias experimentais, como a deposição neuronal precoce de lipofuscina (248, 251), o empobrecimento das arborizações dendríticas e a diminuição do número de neurónios, é de admitir, como já se referiu, poder o álcool desencadear mecanismos que levam a senescência neuronal precoce (26, 55, 85, 86, 173, 211).

Os prolongamentos celulares distróficos e as placas senis são achados frequentes em certas áreas do sistema nervoso central do Homem idoso (252, 253, 292). Porém, e por razões desconhecidas, estas estruturas só muito raramente são observadas nos animais (31, 64, 115, 288) com excepção do Macaco e do Cão (30, 289). Porém, mesmo no Homem e em situações patológicas que se julgam estar relacionadas com o envelhecimento, como é o caso da demência de Alzheimer, o cerebelo encontra-se quase sempre poupado (188) o que não acontece nos alcoólicos crónicos (141). Este facto corrobora a hipótese de o álcool poder estar relacionado com a presença destas placas no cerebelo do Rato alcoolizado.

Seja qual for o seu significado último, admite-se que os prolongamentos celulares distróficos e as placas neuríticas primitivas resultem, no caso presente, de processos degenerativos dos terminais das fibras paralelas como consequência de factores predisponentes ainda desconhecidos. Saliente-se, porém, ser muito mais comum os terminais das fibras paralelas apresentarem degenerescência de tipo denso com marcada reacção glial.

Em paralelo com a degenerescência axonal era também frequente o aparecimento de degenerescência nos ramos dendríticos terminais e espinhas dendríticas das células de Purkinje. Para valorizar devidamente as repercussões estruturais e funcionais que os fenómenos degenerativos encontrados

têm sobre a camada molecular, recorde-se que uma fracção importante do seu volume depende dos axónios das células granulares e dos dendritos dos restantes neurónios.

As fibras paralelas e as arborizações dendríticas das células de Purkinje e dos interneurónios inibitórios estão dispostos ordenadamente, monopolizando as primeiras a quase totalidade da aferência sináptica (72, 119, 168) sobre as espinhas dendríticas das células de Purkinje. Deste modo se compreende que a degenerescência de um ou dos dois componentes das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje, leve a profunda diminuição das possibilidades de conexão neuronal na camada molecular, factor que adquire ainda maior relevância se se considerar a marcada redução volumétrica desta camada nos animais alcoolizados.

Se se tiver em conta a importância morfofuncional, no circuito cerebeloso, das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje, compreende-se a necessidade de uma determinação cuidada e rigorosa da densidade numérica destas estruturas. De acordo com o que se esperava, após a observação qualitativa, encontrou-se redução significativa e progressiva das densidades numéricas dos contactos sinápticos, após 6 meses de alcoolização.

Em vez da densidade numérica, poderia ter-se recorrido, como o fizeram outros autores (25, 113, 186, 269), ao cálculo do número de sinapses por unidade de área, bem mais simples de determinar; todavia, a sua utilização pode acarretar erros grosseiros na interpretação de resultados visto tratar-se de uma grandeza em muito dependente do tamanho e da forma do contacto sináptico. Com efeito, são maiores as probabilidades de os cortes atingirem os perfis sinápticos mais extensos do que os de pequenas dimensões e daí a possibilidade de se contabilizar predominantemente certos tipos de sinapses. No caso presente, teve-se sempre em conta a eventual influência nas quantificações a efectuar, quer do ângulo de curvatura dos espessamentos pós-sinápticos, quer da área das sinapses, uma vez que a observação qualitativa do material mostrava que, após 6 meses de alcoolização, as sinapses

entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje eram mais extensas nos animais alcoolizados. Daí o ter-se recorrido à análise estereológica do número de contactos sinápticos em detrimento de métodos quantitativos mais simples.

O cálculo da densidade numérica de uma estrutura numa amostra depende, para além da espessura do corte, do seu número por unidade de superfície e ainda das dimensões da referida estrutura (278). Se os dois primeiros factores são relativamente simples de calcular, o mesmo já não se pode dizer do último, especialmente quando as estruturas apresentam irregularidades de forma e não podem ser todas reduzidas a uma «figura» conhecida. Por este motivo, os métodos mais perfeitos para o seu cálculo são os que não entram em linha de conta com a forma, tamanho e orientação da estrutura, possibilitando a determinação das suas dimensões reais, em cortes seriados (59, 239, 262). São, no entanto, muito complexos e pouco práticos para o estudo de amostras muito numerosas.

Dado que, no caso presente, a observação seriada de numerosas sinapses não mostrou grande variabilidade da sua forma nem do seu ângulo de curvatura nos diferentes períodos experimentais, decidiu-se, uma vez ponderadas as dificuldades mencionadas, considerar as sinapses como discos circulares planos e, nesta base, calcular as suas densidades numéricas. Utilizou-se uma modificação do método de desdobramento (159, 160) descrito por Weibel (278) que permite calcular a distribuição da frequência das sinapses a partir da dos seus perfis e, deste modo, calcular o diâmetro médio e a área média dos discos sinápticos e as suas densidades numéricas. A opção feita pelo método do desdobramento dependeu da possibilidade de recurso a métodos computadorizados, sem os quais a sua aplicação era problemática. Sabendo-se, como se disse, a forma aproximada da estrutura a estudar, a utilização deste método torna possível o cálculo das densidades numéricas das sinapses em amostras muito mais significativas com rigor semelhante ao dos métodos que utilizam cortes seriados (59, 239, 262). A comprovar a sua eficácia e credibilidade aponta o facto de os resultados

obtidos para a densidade numérica das sinapses dos grupos de controlo e dos grupos de animais alcoolizados durante 1 e 3 meses, se terem mostrado sobreponíveis aos encontrados por Heinsen e Heinsen (105) nas sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje no lóbulo VI com o método de Mayhew (149) e calculado com a programação de Cruz-Orive (60), e só cerca de 10% inferiores aos determinados por Verwer e DeGroot com cortes seriados (262).

Conforme se referiu, encontrou-se marcada diminuição do número de contactos sinápticos e redução da área total média das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje, no neurópilo da camada molecular. Porém, esta redução nos animais alcoolizados não se mostrou tão acentuada como a que seria de esperar, devido à ocorrência de um processo evidente de reorganização da camada molecular, que tornaria menos acentuada nesses animais a redução da área activa do neurópilo, primordial para o normal funcionamento do circuito cerebeloso.

Esta reorganização estrutural teve por base alterações plásticas centradas em dois tipos de sinapses: fibras paralelas-espinhas dendríticas das células de Purkinje e fibras paralelas-dendritos de interneurónios. Nas primeiras, as alterações plásticas abrangiam, quer os componentes pré-sinápticos, quer os elementos pós-sinápticos. As modificações mais precoces surgiam, após 6 meses de alcoolização, quando se começaram a visualizar espinhas dendríticas de células de Purkinje muito alongadas e de colo muito fino. Estabeleciam contactos sinápticos com terminais de fibras paralelas que, por sua vez, após 12 meses de alcoolização, apresentavam grande aumento das suas dimensões. Para além das espinhas alongadas, outras apresentavam formas anormais, semelhantes às encontradas em situações também caracterizadas pela diminuição das fibras paralelas (45, 46, 109, 112, 231). É tentador sugerir que as espinhas alongadas seriam provavelmente aquelas que, privadas dos seus aferentes, iriam estabelecer contacto com outras estruturas pré-sinápticas. Apoia esta hipótese o facto de se visualizarem numerosas

espinhas deaferenciadas dispersas na camada molecular e, ainda, terminais de fibras paralelas que mantinham as densidades pré-sinápticas faltando-lhes o componente pós-sináptico. A reutilização das densidades pós-sinápticas livres (46, 190, 234) só é possível no caso da deaferenciação ser parcial (46, 112) e de estarem presentes os mecanismos indispensáveis à actividade plástica, como parece ser o caso das vesículas revestidas, visíveis com frequência no pé de muitas destas espinhas, que participam activamente no processo de renovação de membrana do plasmalema neuronal (7, 152, 153), e ainda a existência de filamentos de actina na cabeça e colo das espinhas (127), responsáveis pela maioria das modificações plásticas que ocorrem a nível celular (23, 46, 78, 79, 109, 127, 153). Saliente-se, no entanto, que o alongamento das espinhas não deverá deixar de conduzir a marcada disfunção do circuito cerebeloso (193).

A presença de densidades pós-sinápticas livres é um dos principais factores de indução de «sprouting» dos terminais aferentes (46, 112). No córtex cerebeloso o «sprouting» das fibras paralelas é contudo limitado, uma vez que estas estruturas não têm grande capacidade de se dividir e ramificar (46). Em contrapartida, encontram-se na camada molecular dos animais alcoolizados durante 12 meses, numerosos terminais de fibras paralelas de grandes dimensões muitos deles com densidades pré-sinápticas livres como acontece noutras circunstâncias (236). O aumento da densidade volumétrica destas estruturas parece não ser, neste caso, tradutor de aumento do seu número, mas sim do seu tamanho dado que, com o método de Golgi, não se encontrou alteração do número das varicosidades nos axónios das células granulares. As potencialidades plásticas apresentadas por estes terminais manifestam-se ainda pela existência de varicosidades que contactam simultaneamente múltiplas espinhas dendríticas (46, 190, 234). Em qualquer dos casos, admite-se que a capacidade de remodelação patenteada pelas fibras paralelas poderá estar relacionada com o aumento do número dos seus microtúbulos observado após 3 meses de consumo de álcool (174), situação que nos segmentos ascendentes dos axónios das células granulares só se verifica após 18 meses de experiência (174).

Não se verificou somente a plasticidade dos componentes pré e pós-sinápticos das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje mas também, e esta muito marcada, dos próprios contactos sinápticos (56). Com efeito, à medida que o número de sinapses diminuía, aumentavam os diâmetros e áreas médias das sinapses, de modo semelhante ao descrito por outros autores (45, 46, 77, 109, 111). A correlação descrita entre número e área média das sinapses é de molde a atenuar, embora limitadamente, a diminuição da área total média dos contactos sinápticos, muito reduzida nos animais alcoolizados.

Segundo Sotelo (231), os neurónios do córtex cerebeloso estariam intrinsecamente programados para a produção de uma quantidade específica de proteínas receptoras. Quando se verifica diminuição desta, como poderá acontecer nos animais alcoolizados e à semelhança do que sucede noutras situações (45, 46, 77, 109, 111), os espessamentos pós-sinápticos tornam-se maiores, o que se verificou nos grupos de animais alcoolizados e até com localizações pouco usuais. Neste complexo processo não se deve, porém, esquecer o papel desempenhado pelas estruturas pré-sinápticas pois na sua ausência as densidades pós-sinápticas tornam-se sistemática e uniformemente mais pequenas (47, 112).

Relativamente às sinapses entre as fibras paralelas e os dendritos de interneurónios, a densidade numérica destes contactos encontrava-se significativamente aumentada nos animais alcoolizados, aos 18 meses de experiência. Estas alterações uma vez estabelecidas, do mesmo modo que as sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje, permitirão o aproveitamento, por parte das fibras paralelas, da trama dendrítica ainda disponível na camada molecular e, assim, de algum modo se compensaria a marcada redução da área total dos contactos sinápticos.

A plasticidade dos circuitos cerebelosos pode verificar-se naturalmente, como acontece em certos mutantes, ou em circunstâncias patológicas e experimentais (10, 46, 111, 112,

143, 178, 192, 234, 235), dependendo do tipo de processo em curso o grau de adaptação morfológica. Nos animais alcoolizados e apesar dos múltiplos aspectos de reorganização tendentes a manter a área sináptica total, as alterações encontradas no número e na proporção dos diferentes tipos de contactos sinápticos traduzem a existência de profundas alterações no padrão das conexões neuronais e, conseqüentemente, da eficiência do circuito cerebeloso.

Circuito Cerebeloso e Consumo Crônico de Alcool

Os diversos componentes do circuito cerebeloso encontram-se interligados de modo a que os estímulos que veiculam atinjam o seu elemento central — a célula de Purkinje*. Em circunstâncias normais e em repouso, a célula de Purkinje tem acção inibitória sobre as células dos núcleos centrais que possuem um «background» de excitabilidade, em grande parte dependente da acção de colaterais das fibras trepadoras e musgosas. Por este motivo, pode dizer-se que o resultado final da actividade cerebelosa resulta do somatório das variações excitação-inibição das células subcorticais conseqüência, afinal, da actividade das células de Purkinje.

Demonstrou-se que a organização estrutural do córtex cerebeloso do Rato adulto é profundamente afectada pelo consumo crónico de álcool. De modo progressivo, e dependentes do tempo de alcoolização, instalam-se alterações marcadas de dois tipos que modificam essa organização e se reflectem nos circuitos neuronais. Umas são de tipo degenerativo com características diversas consoante a fase da alcoolização e a estrutura cerebelosa lesada, enquanto outras, de aparecimento mais tardio, são de índole reorganizativa. Estas últimas atenuariam, de algum modo, os efeitos das primeiras.

* Para revisão e recolha de bibliografia pormenorizada sobre aspectos funcionais do circuito cerebeloso ver 71, 72, 119, 147.

Dos sistemas de fibras aferentes do córtex cerebeloso, o das fibras musgosas não apresenta, após consumo crónico de álcool, alterações de monta; pelo contrário, o complexo sináptico em que se integram os seus terminais, formando o elemento central do glómulo cerebeloso, encontra-se profundamente modificado, em consequência da perda de grande número de dendritos das células granulares e da actividade reorganizativa patenteada pelos seus elementos constitutivos, nomeadamente pelo aparecimento de sinapses neo-formadas com os dendritos das células de Golgi.

As células granulares são, de todos os elementos celulares do córtex cerebeloso, as mais afectadas pelo consumo de álcool havendo diminuição progressiva do seu número, após 6 meses de alcoolização. A degenerescência destas células não é uniforme, encontrando-se áreas muito mais afectadas do que outras. A morte do pericário é precedida pela perda das ramificações mais distais dos dendritos, processo com marcadas implicações funcionais a nível do circuito cerebeloso, uma vez que o número e a integridade destas células são factores indispensáveis para a sua normal despolarização. Em circunstâncias normais, uma célula granular vence com mais facilidade o limiar da excitabilidade se for estimulada por duas fibras musgosas diferentes. Este facto, aliado à disposição das rosetas na camada granular, leva a que o número de células granulares plenamente activadas não seja tão grande como se poderia supôr atendendo à grande divergência patenteada pelo sistema das fibras musgosas; existe sempre, com efeito, uma grande população de células em estado sub-liminar de excitabilidade.

O número de células granulares activadas pelos terminais das fibras musgosas deverá ser consequentemente muito menor nos animais alcoolizados, do que o verificado em condições normais, quer devido à perda das suas ramificações periféricas, quer devido à diminuição do número de células. Deste modo, a vertente excitatória do circuito cerebeloso fica muito reduzida. A diminuição dessa actividade é ampliada pela redução do número de axónios de células granulares que contactam as árvores dendríticas das células de Purkinje.

A influência dos axónios das células granulares que contactam as árvores dendríticas das células de Purkinje depende, em muito, de grupos de células granulares activadas subjacentes às células de Purkinje, capazes de modificarem directamente os seus potenciais (27, 142), e das fibras paralelas que, activadas assincronamente ao longo de toda a árvore, modulam a actividade excitatória desencadeada pelos referidos axónios ascendentes (142). A conjugação dos dois tipos de actividade mediados pelos axónios das células granulares é necessária à normal despolarização da célula de Purkinje. Compreende-se, pois, que a degenerescência de tipo focal das células granulares, aliada à diminuição marcada do número de fibras paralelas, leve a um marcado decréscimo da actividade das células de Purkinje. Acresce, ainda, que estas células apresentam redução da sua área receptora após os 6 meses de alcoolização, em consequência de degenerescência dendrítica, nomeadamente dos seus ramos terminais e das suas espinhas, elementos fulcrais para a recepção dos estímulos veiculados pelos axónios das células granulares. A função normalmente desempenhada pelas células de Purkinje no circuito cerebeloso encontra-se ainda mais afectada aos 18 meses de alcoolização, pela sua própria degenerescência e diminuição consecutiva do número total dessas células.

As fibras paralelas também estabelecem, embora com menor frequência, contactos sinápticos com as árvores dendríticas dos interneurónios. Destes, as células em cesto actuando sobre as células de Purkinje que se localizam lateralmente aos seus corpos celulares, fazem sentir a sua acção inibitória nas áreas que bordejam as zonas corticais mais estimuladas e contribuem para delimitar fronteiras entre as zonas activadas e as inibidas. Nos animais alcoolizados a actividade destas células deverá estar diminuída, como consequência da redução do seu número e dos fenómenos degenerativos que levam ao empobrecimento do seu domínio dendrítico. É pois de prever o esbatimento dos limites, em circunstâncias normais bem definidos, entre as zonas corticais activadas e inibidas, e portanto, a ocorrência de marcadas alterações funcionais.

Em resumo, as alterações degenerativas induzidas no circuito cerebeloso pelo consumo crónico de álcool motivam, para além da diminuição do número de circuitos funcionantes, o aparecimento de áreas corticais onde, como consequência da falta de actividade inibitória das células em cesto (e eventualmente das estreladas do 1/3 externo), a actividade é difusa, não circunscrita a áreas bem delimitadas, sendo provavelmente sub-liminar, incapaz de desencadear resposta das células de Purkinje. Pelo contrário, o aumento da extensão da área cortical activada, cria as condições necessárias para uma facilitação da estimulação das células de Golgi. Com efeito, a activação destas células depende, em circunstâncias normais, da área cortical molecular activada, só se verificando quando esta, pela intensidade do foco aferente, ultrapassa os limites definidos pelas células em cesto. No caso dos animais alcoolizados, embora o aumento da área cortical activada tenha origem diversa, criam-se as condições para a estimulação destes interneurónios, cujos dendritos, nestas circunstâncias, apresentam até número muito superior de sinapses com as fibras paralelas.

Os axónios das células de Golgi articulam-se directamente com os dendritos das células granulares e têm, em circunstâncias normais, uma função de «clearing» sobre as excitadas sub-liminarmente (como consequência de insuficiente activação). Nos animais alcoolizados, a activação das células de Golgi reforçará a actividade inibitória do circuito cerebeloso. Para além da hipótese agora apresentada, deve referir-se ainda o aumento do número de contactos directos dos dendritos destas células com os terminais das fibras musgosas, a par da manutenção do número de sinapses entre os terminais das células de Golgi e os dendritos das células granulares.

No sistema nervoso, à actividade degenerativa opõem-se, regra geral, fenómenos de reorganização (23, 54). O aparecimento de alterações plásticas depende da capacidade das células nervosas se adaptarem às modificações do seu meio. Tais alterações de carácter reorganizativo traduzem-se por

modificações das zonas mais activas, que podem, assim, variar no seu número ou na sua extensão segundo os condicionamentos homeostáticos.

Nos animais submetidos a alcoolização crónica, mesmo na presença do tóxico, há sinais francos de actividade reconstitutiva nos elementos do circuito cerebeloso. Na camada granular, salientam-se os processos reorganizativos do glómulo cerebeloso onde a diminuição numérica das sinapses entre as fibras musgosas e os dendritos das células granulares acaba por ser compensado pelo aparecimento de extensos contactos sinápticos entre os terminais de fibras musgosas e os dendritos de células de Golgi. Na camada molecular são evidentes as modificações dos terminais das fibras trepadoras e, mais acentuadamente, as modificações sofridas pelas sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje e entre as fibras paralelas e os dendritos de interneurónios. Nas primeiras, os fenómenos reorganizativos caracterizam-se pelo aumento de tamanho dos botões pré-sinápticos das fibras paralelas, por crescimento anormal das espinhas dendríticas das células de Purkinje e por aumento da área das sinapses, tornando-se os contactos sinápticos mais extensos. Nas sinapses entre as fibras paralelas e os dendritos de interneurónios, regista-se um aumento do número destes contactos sinápticos.

Se bem que os processos reorganizativos funcionem como mecanismos de compensação da redução da área sináptica total do córtex cerebeloso, cuja constância é indispensável para o normal funcionamento dos seus circuitos, nem sempre serão funcionalmente eficazes. Entre eles os que terão maior repercussão funcional serão, por certo, o aumento da área das sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje e o aumento do número de sinapses sobre os dendritos dos interneurónios. Apesar disso as sinapses neo-formadas sobre as espinhas dendríticas das células de Purkinje e interneurónios não serão suficientes para compensar os fenómenos degenerativos. Do ponto de vista funcional, pensa-se até que as alterações da geometria das espinhas dendríticas que ocorrem nestas circunstâncias, poderão dificultar o processo da despolarização induzida pela

estimulação sináptica, dado o aumento da resistividade condicionado pelo alongamento das espinhas, reduzindo-se assim, a eficiência dos novos contactos sinápticos.

Há que atender, ainda, às modificações (degenerativas-reorganizativas) encontradas no sistema das fibras trepadoras que, por si só, terão marcadas implicações no tipo de resposta da célula de Purkinje e que potenciarão, por certo, as alterações dependentes do sistema fibra musgosa - célula granular - célula de Purkinje.

RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo dos efeitos do álcool sobre o sistema nervoso é de há muito, alvo de atenção de numerosos grupos de investigação. Tal facto está relacionado com a importância médica, social, económica e sanitária que se atribui ao alcoolismo.

No sistema nervoso central o cerebelo é uma das partes mais vulneráveis à acção do álcool, como o demonstraram múltiplos estudos necrópsicos, insuficientes, porém, para avaliação pormenorizada dos efeitos do álcool sobre as células nervosas; ao mesmo tempo tornava-se impossível distinguir as alterações induzidas pelo álcool de outras que normalmente resultam de diferentes factores habitualmente associados ao alcoolismo.

Para ultrapassar estas dificuldades foi necessário o recurso a modelos animais de alcoolização crónica que estão na base de numerosos trabalhos experimentais. São, no entanto, escassos os estudos de índole morfológica, ao contrário do que sucede com os fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos. Esta lacuna, por si só, tornava incompleta a avaliação dos efeitos do álcool sobre o neurónio. Impunha-se, pois, obter elementos morfológicos mais pormenorizados a nível da organização global do circuito cerebeloso através da análise dos seus diferentes constituintes após longos períodos de alcoolização, uma vez que o resultado final das operações corticais cerebelosas, tal como acontece nos outros circuitos neuronais, depende da integridade dos seus diferentes elementos e ainda da das suas conexões normais.

Com esta finalidade, procedeu-se à alcoolização de grupos de ratos adultos durante 1, 3, 6, 12 e 18 meses com uma

solução aquosa contendo 20% de etanol, submetendo-se grupos correspondentes de animais testemunha ao mesmo controlo nutricional.

Estudou-se qualitativa e quantitativamente com microscopia de luz material incluído em parafina, em resina de inclusão e impregnado pela prata, a par de outro analisado ultrastruturalmente.

As investigações levadas a cabo mostraram que o modelo animal utilizado (independentemente de alguns inconvenientes que se lhe reconhecem) preencheu as condições necessárias para avaliação dos efeitos da administração crónica de álcool sobre o córtex cerebeloso.

Em síntese, verificou-se nos animais submetidos a alcoólização crónica, e como efeitos da neurotoxicidade do etanol:

1. A diminuição significativa dos volumes das camadas do córtex do cerebelo e do da substância branca.
2. A presença de alterações plásticas dos terminais das fibras trepadoras.
3. Na camada granular, redução marcada do número de células granulares sem alterações numéricas das células de Golgi, tendo-se observado nos glomérulos cerebelosos após um período em que predominavam os fenómenos degenerativos, profunda reorganização estrutural com o aparecimento de grande número de sinapses entre os terminais das fibras musgosas e os dendritos das células de Golgi, em detrimento das sinapses entre as fibras musgosas e os dendritos das células granulares.
4. Redução do número de células de Purkinje no período final da experiência, precedida de marcadas alterações conducentes ao empobrecimento das suas arborizações dendríticas.

5. Na camada molecular, sinais de degenerescência axonal e dendrítica com abundantes perfis axonais distróficos, por vezes agrupados, formando placas senis de tipo primitivo, e redução do número de sinapses entre as fibras paralelas e as espinhas dendríticas das células de Purkinje. Em compensação, os valores do diâmetro e da área média destas sinapses, apresentavam-se aumentados o que de algum modo atenuaria as consequências da marcada diminuição da área total média das sinapses.
6. Marcadas potencialidades plásticas dos terminais das fibras paralelas traduzidas pela presença de contactos múltiplos entre esses terminais e as espinhas dendríticas das células de Purkinje e pelo aumento do número de sinapses com os dendritos dos interneurónios.
7. Redução do número de interneurónios da camada molecular e empobrecimento apreciável das árvores dendríticas das células em cesto.

A análise global destes resultados permite concluir que a organização estrutural do córtex cerebeloso do Rato adulto é profundamente afectada pelo consumo crónico de álcool. A par das alterações degenerativas observadas e descritas na quase totalidade dos elos do circuito cerebeloso, observou-se também evidente actividade reorganizativa, insuficiente, todavia, para atenuar as consequências daquelas, por não conseguir restabelecer qualitativa e quantitativamente o circuito cerebeloso. A acção neurotóxica crónica do álcool acarreta a diminuição do número de circuitos cerebelosos e o aparecimento de neo-conexões entre neurónios, mas de padrão diferente das existentes nos animais normais.

Demonstrou-se deste modo, no animal escolhido para esta investigação, a ocorrência de lesões graves da estrutura do córtex do cerebelo determinadas pela acção do etanol. É de aceitar que factos análogos se passem em outras espécies animais e portanto também no Homem, explicativos dos quadros que se manifestam nas fases mais avançadas da degradação funcional do sistema nervoso dos alcoólicos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In the last few years, various research groups have paid particular attention to the study of the effects of ethanol on the nervous system, obviously because of the medical, social, economic and sanitary importance of chronic alcoholism.

Numerous necropsic studies have demonstrated that, within the central nervous system, the cerebellum is one of the areas which is most vulnerable to the effects of alcohol. These studies, however, were insufficient for a detailed evaluation of the morphological effects of ethanol on nerve cells and did not allow to distinguish between alcohol-induced alterations and those resulting from different factors frequently linked to alcoholism.

In an attempt to overcome these difficulties, many authors based their work on experimental models of chronic alcohol consumption. The scarcity of morphological studies, as opposed to the many physiological, biochemical and pharmacological investigations, makes it difficult to get a complete evaluation of the effects of alcohol on the neuron. It thus became evident that an analysis of the various components of the cerebellar circuitry after long periods of alcohol consumption was necessary to obtain more detailed morphological data, since the final processing of cerebellar cortical operations, and to a certain extent, that of other neuronal circuitry, depends on the integrity of their different elements as well as on the latter's normal connections.

With this in mind, groups of adult rats were alcohol-fed for periods of 1, 3, 6, 12 and 18 months, with a 20% aqueous ethanol solution. The respective controls were pair-fed.

Light microscopic qualitative and quantitative observations were made in paraffin, epon embedded and silver-impregnated material. For ultrastructure routine procedures were used.

The results obtained showed that the animal model, although far from perfect, was good enough to fulfill the conditions necessary for an evaluation of the effects of long-term alcohol consumption on the cerebellar cortex.

In brief, it was observed that under those conditions:

1. There was a significant decrease in volume of the cerebellar cortical and myelinated layers.
2. There were plastic changes in the climbing fibers.
3. In the granular layer, there was a marked decrease in the number of granule cells but not of Golgi cells. After a period in which degenerative phenomena predominated, the cerebellar glomeruli presented a marked structural reorganization with the appearance of a great many synapses between the mossy fiber endings and the dendrites of the Golgi cells, to the detriment of the synapses between the mossy fibers and the dendrites of the granule cells.
4. There was a decrease in the number of Purkinje cells at the end of the experiment which was preceded by marked alterations leading to an impoverishment of their dendritic trees.
5. Axonal and dendritic degeneration was clearly seen in the molecular layer. Dystrophic profiles were numerous often assembled forming primitive senile plaques. A decrease in synapses between parallel fiber boutons and the spine dendrites of the Purkinje cells was also noted, whereas the diameter and mean

area of these synapses were increased, which would to a certain extent, attenuate the expected overall reduction of the mean total synaptic area.

6. The parallel fiber boutons showed marked plastic capabilities, as shown by the presence of multiple contacts between these and the dendritic spines of the Purkinje cells and by the increase in synapses with interneuronal dendrites.
7. There was a decrease of interneurons of the molecular layer, and an impoverishment of basket cell dendritic trees.

Taking these results together it is safe to conclude that chronic alcohol consumption has a marked effect on the structural organization of the cerebellar cortex of the adult rat. Aside from the degenerative alterations observed in almost all the components of the cerebellar circuitry, there also was evidence of neuronal regrowth, but this was insufficient to attenuate the consequences of the degeneration as it could not, reestablish the cerebellar circuitry. The paramount neurotoxic effect of alcohol in the cerebellar cortex of the adult rat is a decrease in the number of its cerebellar circuitry and the appearance of newly-formed connections between neurons, albeit morphologically different from those usually observed.

The abnormalities reported herein were found in the rat. However, it would not be forward to assume that similar changes might also occur in Man and could be the neuropathological foundation of the ethanol-induced changes observed in the central nervous system of chronic alcoholics.

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, 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
- 4 — Adams R D, Victor M (1981) Alcohol and alcoholism. Em: *Principles of Neurology 2ª Edição*. Ed: R D Adams, M Victor. Mc Graw-Hill, New York. 746-762
- 5 — Allsop J, Turner B (1966) Cerebellar degeneration associated with chronic alcoholism. *J Neurol Sci* 3: 238-258
- 6 — Alonso-Fernandez F (1979) Bases Psicosociales del Alcoholismo. Instituto de España Real. Academia Nacional de Medicina
- 7 — Altman J (1971) Coated vesicles and synaptogenesis: a developmental study in the cerebellar cortex of the rat. *Brain Res* 30: 311-322
- 8 — Altman J (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. Em: *The Cerebellum-New Vistas*. Ed: S L Palay, V Chan-Palay. *Exp Brain Res Suppl* 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 8-49
- 9 — Alves P S, Pinto-Correia J P, Borda d'Água C, Portugal L, Capaz V, Rodrigues M L, Rodrigues H L (1982) Alcoholic liver diseases in Portugal. Clinical and laboratory picture, mortality and survival. *Alcoholism: Clin Exp Res* 6: 216-224
- 10 — Anderson W A, Flumerfelt B A (1984) Long-term effect of mossy fiber degeneration in the rat. *J Comp Neurol* 227: 414-423

- 11 — Angaut P, Alvarado-Mallart R M, Sotelo C (1982) Ultrastructural evidence for compensatory sprouting of climbing and mossy afferents to the cerebellar hemisphere after ipsilateral pedunculotomy in the newborn rat. *J Comp Neurol* 205: 101-111
- 12 — Angelo V (1977) Aspectos da mortalidade por cirrose-1975. *Bol Mensal Estatística I N E (Lisboa)* 10 (3): 3-13
- 13 — Bach G (1967) Kugelgrößenverteilung und Verteilung der schnittkreise; ihre wechselseitiger Beziehungen und Verfahren zur bestimmung der einen aus der anderen. Em: *Quantitative Methods in Morphology*. Ed: E R Weibel, H Elias. Springer-Verlag, Berlin, New York. 23-45
- 14 — Baetens D, Garcia-Segura L M, Perrelet A (1982) Effects of climbing fiber destruction on larfe dendrite spines of Purkinje cells. *Exp Brain Res* 48: 256-262
- 15 — Baldessarini R J, Fisher J E (1975) citado por Forsander O (1980) Comments on progress in the use of animal models in alcohol research. Em: *Animal Models in Alcohol Research*. Ed: K Eriksson, J D Sinclair, K Kiianmaa. Academic Press, London. 484-489
- 16 — Ball M J, Lo P (1977) Granulovacuolar degeneration in the ageing brain and in dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 36: 474-487
- 17 — Ballentine J O (1975) Dendritic degeneration following hyperbaric oxygen exposure. Em: *Advances in Neurology V 12: Physiology and Pathology of Dendrites*. Ed: G W Kreutzberg. Raven Press, New York. 471-481
- 18 — Barnes D E, Walker D W (1981) Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Develop Brain Res* 1: 333-340
- 19 — Bauer-Moffett C, Altman J (1977) The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. *Brain Res* 119: 249-268
- 20 — Begleiter H (1981) Brain dysfunction and alcoholism: problems and prospects. *Alcoholism: Clin Exp Res* 5: 264-266
- 21 — Berry M, Bradley P (1976) The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res* 112: 1-35
- 22 — 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. Em: *Advances in Neurology V 12: Physiology and Pathology of Dendrites*. Ed: G W Kreutzberg. Raven Press, New York. 217-245

- 23 — Bishop B, Craik R L (1982) Neural Plasticity Ed: B Bishop, R L Craik. Amer Phys Ther Assoc V 62
- 24 — Blank N K, Seil F J, Herndon R M (1982) An ultrastructural study of cortical remodeling in cytosine arabinoside induced granulooprival cerebellum in tissue culture. Neuroscience 7: 1509-1531
- 25 — 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
- 26 — Blusewicz M J, Dustman R E, Schenkenberg T, Beck E C (1977) Neuropsychological correlates of chronic alcoholism and aging. J Nerv Ment Dis 165: 348-355
- 27 — Bower J M, Woolston D C (1983) citado por 119
- 28 — Boycott B B (1982) Some further comments concerning dendritic spines. Trends NeuroSci 5: 328-329
- 29 — Bradley P, Berry M (1976) Quantitative effects of climbing fibre deafferentation on the adult Purkinje cell dendritic tree. Brain Res 112: 133-140
- 30 — Braunmuhl A (1956) Kongophile Angiopathie und senile Plaques bei greisen Hunden. Arch Psychiatr Wervenkr 194: 396-414
- 31 — Brizzee K R, Ordy J M, Hoffer H, Kaack B (1978) Animal models for the study of senile brain disease and aging changes in the brain. Em: Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Conditions. Ed: R Katzman, R D Terry, K L Beck. Raven Press, New York. 515-553
- 32 — Brizzee K R, Samorajski T, Brizzee D L, Ordy J M, Dunlap W, Smith R (1983) Age pigments and cell loss in the mammalian nervous system: functional implications. Em: Brain Aging: Neuropathology and Neuropharmacology. Ed: J Cervós-Navarro, H J Sarkander. Raven Press, New York. 211-229
- 33 — Brunk U, Ericsson J L E (1972) Electron microscopical studies on rat brain neurons. Localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofuscin bodies. J Ultrastruct Res 38: 1-15
- 34 — Buell S J, Coleman P D (1981) Quantitative evidence for selective dendritic growth in normal human aging but not in senile dementia. Brain Res 214: 23-41

- 35 — 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
- 36 — Carlen P L, Wilkinson A, Wortzman G, Holgate R, Cordingley J, Lee M A, Huszar L, Moddel G, Singh R, Kirali L, Rankin J G (1981) Cerebral atrophy and functional deficits in alcoholics without clinically apparent liver disease. *Neurology* 31: 377-385
- 37 — Cederbaum A I, Rubin E (1975) Molecular injury to mitochondria produced by ethanol and acetaldehyde. *Fed Proc* 34: 2045-2051
- 38 — Chan-Palay V (1972) Arrested granule cells and their synapses with mossy fibers in the molecular layer of the cerebellar cortex. *Z Anat Entwickl Gesch* 139: 11-20
- 39 — Chan-Palay V (1975) Fine structure of labelled axons in the cerebellar cortex and nuclei of rodents and primates after intraventricular infusions with tritiated serotonin. *Anat Embryol* 148: 235-265
- 40 — Chan-Palay V (1977) Cerebellar Dentate Nucleus: Organization Cytology and Transmitters. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 390-463
- 41 — Chan-Palay V (1982) Neurotransmitters and receptors in the cerebellum: immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase, GABA-transaminase, and cyclic GMP and autoradiography with ³H Muscimol. *Em: The Cerebellum — New Vistas*. Ed: S L Palay, V Chan-Palay. *Exp Brain Res Suppl* 6. Springer Verlag, Berlin. 552-586
- 42 — Chan-Palay V, Palay S L (1971) Tendril and glomerular collaterals of climbing fibers in the granular layer of the rat's cerebellar cortex. *Z Anat Entwickl-Gesch* 133: 247-273
- 43 — Chan-Palay V, Palay S L (1971) The synapse «en marron» between Golgi II neurons and mossy fiber in the rat's cerebellar cortex. *Z Anat Entwickl-Gesch* 133: 274-289
- 44 — Chan-Palay V, Palay S L (1972) The stellate cells of the rat's cerebellar cortex. *Z Anat Entwickl-Gesch* 136: 224-248
- 45 — Chen S, Hillman D E (1980) Giant spines and enlarged synapses induced in Purkinje cells by malnutrition. *Brain Res* 187: 487-493
- 46 — Chen S, Hillman D E (1982) Plasticity of the parallel fiber-Purkinje cell synapses by spine takeover and new synapse formation in the adult rat. *Brain Res* 240: 205-220

- 47 — Chen S, Hillman D E (1982) Marked reorganization of Purkinje cell dendrites and spines in adult rat following vacating of synapses due to deafferentation. *Brain Res* 245: 131-135
- 48 — Cicero T J (1979) A critique of animal analogues of alcoholism. *Em: Biochemistry and Pharmacology of Ethanol V II*. Ed: E Majchrowicz, E P Noble. Plenum Press, New York, London. 533-560
- 49 — Cicero T J (1980) Animal models of alcoholism? *Em: Animal Models in Alcohol Research*. Ed: K Eriksson, J D Sinclair, K Kiianmaa. Academic Press, London. 99-117
- 50 — Connor J R, Diamond M C, Johnson R E (1980) Aging and environmental influences on two types of dendritic spines in the rat occipital cortex. *Exp Neurol* 70: 371-379
- 51 — Conover W J (1980) *Non-parametric Statistics*. Wiley, New York
- 52 — Cooke C T, Nolan T M, Dyson S E, Jones D G (1974) Pentobarbital-induced configurational changes at the synapse. *Brain Res* 76: 330-335
- 53 — Cotman C W, Nadler J V (1978). Citado por 240
- 54 — Cotman C W, Nieto-Sampedro M (1984) Cell biology of synaptic plasticity. *Science* 225: 1287-1294
- 55 — Courville C B (1955) *Effects of Alcohol on the Nervous System of Man*. San Lucas Press, Los Angeles
- 56 — Cragg B G (1972) Plasticity of synapses. *Em: The Structure and Function of Nervous System IV (Physiology II and Biochemistry II)*. Ed: G M Bourne. Academic Press, New York, London. 2-60
- 57 — Crick F (1982) Do dendritic spines twitch? *Trends NeuroSci* 5: 44-46
- 58 — Cruz-Orive L M (1978) Particle size-shape distributions: the general spheroid problem II Stochastic model and practical guide. *J Microsc* 112: 153-167
- 59 — Cruz-Orive L M (1980) On the estimation of particle number. *J Microsc* 120: 15-27
- 60 — Cruz-Orive L M (1983) Distribution-free estimation of sphere size distributions from slabs showing overprojection and truncation with a review of previous methods. *J Microsc* 131: 265-290

- 61 — Curcio C A, Coleman P D (1982) Stability of neuron number in cortical barrels of aging mice. *J Comp Neurol* 212: 158-172
- 62 — Curcio C A, Buell S J, Coleman P D (1982) Morphology of the aging nervous system: not all downhill. Em: *The Aging Motor System*. *Adv Neurogerontol* V 3. Ed: J A Mortimer, F J Pirozzolo, D J Maletta. Praeger, New York. 7-35
- 63 — Davies C A, Katz H B (1983) The comparative effects of early-life undernutrition and subsequent differential environments on the dendritic branching of pyramidal cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 218: 345-350
- 64 — Dayan A D (1971) Comparative neuropathology of ageing. Studies on the brain of 47 species of vertebrates. *Brain* 94: 31-42
- 65 — De Carli L M, Lieber C S (1967) Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr* 91: 331-336
- 66 — De Hoff R T, Rhines F N (1961). Citado por 279
- 67 — De Voogd T J, Chang F L F, Floeter M K, Jencius M J, Greenough W T (1981). Citado por 63
- 68 — Desclin J C, Colin F (1980) The olivocerebellar system. II Some ultrastructural correlates of inferior olive destruction in the rat. *Brain Res* 187: 29-46
- 69 — Dunmire C R, LaVelle F W (1983) Effect of ethanol on nucleolar structure: a cytological indication of change in RNA/protein synthesis. *Anat Rec* 206: 363-371
- 70 — Dustin P (1984) *Microtubules*. Springer-Verlag, Berlin
- 71 — Eccles J C (1969) The inhibitory pathways of the central nervous system. *The Sherrington Lectures IX*. Liverpool University Press. 74-100
- 72 — Eccles J C, Ito M, Szentágothai J (1967) *The Cerebellum as a Neuronal Machine*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 73 — 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

- 74 — Fairén A, Peters A, Saldanha J (1977) A new procedure for examining Golgi impregnated neurons by light and electron microscopy. *J Neurocytol* 6: 311-337
- 75 — Feldman M L, Peters A (1979) A technique for estimating total spine numbers on Golgi-impregnated dendrites. *J Comp Neurol* 188: 527-542
- 76 — 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
- 77 — Fifková E (1970) The effect of monocular deprivation on the synaptic contacts of the visual cortex. *J Neurobiol* 1: 285-294
- 78 — Fifková E, Delay R J (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95: 345-350
- 79 — Fifková E, Van Harraveld A (1977) Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. *J Neurocytol* 6: 211-230
- 80 — Fonseca A F (1980) Aspectos clínicos, psicológicos e sociais do alcoolismo. *Boletim Depart S Mental, F M P, II Série, Ano II, 3: 7-16*
- 81 — Foulds G A, Hassall C (1969) The significance of age of onset of excessive drinking in male alcoholics. *Br J Psychiat* 115 1027-1032
- 82 — French S W (1979) Role of mitochondrial damage in alcoholic liver disease. Em: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol* V I. Ed: E Majchrowicz, E P Noble. Plenum Press, New York, London. 409-432
- 83 — Freund G (1970) Alcohol consumption and its circadian distribution in mice. *J Nutr* 100: 30-36
- 84 — Freund G (1973) Chronic central nervous system toxicity of alcohol. *Annu Rev Pharmacol* 13: 217-227
- 85 — Freund G (1982) Interactions of aging and chronic alcohol consumption on the central nervous system. Em: *Alcoholism and Aging: Advances in Research*. Ed: W G Wood, M F Elias. C R C Press Inc, Boca Raton. 132-148
- 86 — Freund G (1982) The interaction of chronic alcohol consumption and aging on brain structure and function. *Alcoholism: Clin Exp Res* 6: 13-21

- 87 — Garcia-Segura L M, Perrelet A (1982) Climbing fiber destruction affects dendrite and spine membrane organization in Purkinje cells. *Brain Res* 236: 253-260
- 88 — Geller I, Purdy R H (1979) Interrelationship between ethanol consumption and circadian rhythm. Em: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol V 2*. Ed: E Majchrowicz, E P Noble. Plenum Press, New York, London. 453-465
- 89 — Ghetti B, Horoupian D S, Wisniewski H M (1975) Acute and long-term transneuronal response of dendrites of lateral geniculate neurons following transection of the primary visual afferent pathway. Em: *Advances in Neurology V 12: Physiology and Pathology of Dendrites*. Ed: G W Kreutzberg. Raven Press, New York. 401-424
- 90 — Gilroy J, Meyer J S (1979) *Medical Neurology*. 3ª Edição. Macmillan Publish Co, Inc, New York. 272-278
- 91 — Goldsmith P L (1967) The calculation of true particle size distribution from the sizes observed in a thin slice. *Brit J Appl Phys* 18: 813-830
- 92 — Goodrick C L (1967) Behavioral characteristics of young and senescent inbred female mice of the C 57 BL/ 6 J strain. *J Gerontol* 22: 459-464
- 93 — Goodwin D W (1979) Genetics determinants of alcoholism. Em: *The Diagnosis & Treatment of Alcoholism*. Ed: J H Mendelson, N K Mello. McGraw-Hill Book Company, New York. 60-82
- 94 — Grafstein B, Forman D S (1980) Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev* 60: 1167-1233
- 95 — Grant G (1975) Retrograde dendritic degeneration. Em: *Advances In Neurology V 12: Physiology and Pathology of Dendrites*. Ed: G W Kreutzberg. Raven Press, New York. 373-379
- 96 — Gray E G (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93: 420-433
- 97 — Gray E G (1961) The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. *J Anat* 95: 345-356
- 98 — Gray E G (1965) *The Synapse: Morphological and Chemical Correlates of Function*. Ed: J D Robertson. *Neurosci Res Progr Bull* 3: 1-79

- 99 — Gray E G (1982) Rehabilitating the dendritic spine. *Trends NeuroSci* 5: 5-6
- 100 — Hámori J, Somogyi J (1982) Presynaptic dendrites and perikarya in deafferented cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci Usa* 79: 5093-5096
- 101 — Hámori J, Szentágothai J (1966) Participation of Golgi neuron processes in the cerebellar glomeruli: an electron microscope study. *Exp Brain Res* 2: 35-48
- 102 — Harris R A (1979) Metabolism of calcium and magnesium during ethanol intoxication and withdrawal. *Em: Biochemistry and Pharmacology of Ethanol V 2*. Ed: E Majchrowicz, E P Noble. Plenum Press, New York, London. 27-41
- 103 — Haug H (1967). Citado por 279
- 104 — Heinsen H (1979) Lipofuscin in the cerebellar cortex of albino rats: an electron microscopic study. *Anat Embryol* 155: 333-345
- 105 — Heinsen H, Heinsen Y L (1983) Quantitative studies on regional differences in Purkinje cell dendritic spines and parallel fiber synaptic density. *Anat Embryol* 168: 361-370
- 106 — Heinsen H, Heinsen Y L (1984) Strain-specific differences in the vermian granular layer of albino rats. *Acta Anat* 119: 165-173
- 107 — Heinsen Y L, Heinsen H (1983) Regionale Unterschiede der numerischen Purkinje-Zell-Dichte in Kleinhirnen von Albinoratten zweier Stämme. *Acta Anat* 116: 276-284
- 108 — Herndon R M (1968) Thiophen induced granule cell necrosis in the rat cerebellum: an electron microscopic study. *Exp Brain Res* 6: 49-68
- 109 — Hillman D E, Chen S (1981) Plasticity of synaptic size with constancy of total synaptic contact area on Purkinje cells in the cerebellum. *Em: Glial and Neuronal Cell Biology. Eleventh International Congress of Anatomy, Part A*. Ed: E A Vidrio, S Fedoroff. Alan Liss, Inc, New York. 229-245
- 110 — Hillman D E, Chen S (1981) Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. I. Quantitation of layer volume and neuron numbers. *Neuroscience* 6: 1249-1262
- 111 — Hillman D E, Chen S (1981) Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. II. Intrinsic determination of total synaptic area on Purkinje cell spines. *Neuroscience* 6: 1263-1275

- 112 — 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
- 113 — 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
- 114 — Hökfelt T, Fuxe K (1969) Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli. *Exp Brain Res* 9: 63-72
- 115 — Hollander J, Barrows Jr C H (1982) Enzymatic studies in senescent rodent brains. *J Gerontol* 23: 174-179
- 116 — Holman R B, Myers R D (1968) Ethanol consumption under conditions of psychogenic polydipsia. *Physiol Behav* 3: 369-371
- 117 — Ikuta F, Hirano A, Zimmerman H M (1963) An experimental study of post-mortem alterations in the granular layer of the cerebellar cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 22: 581-593
- 118 — Inouye M, Oda S I (1980) Strain-specific variations in the folial pattern of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 190: 357-362
- 119 — Ito M (1984) *The Cerebellum and Neural Control*. Raven Press, New York
- 120 — 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
- 121 — Kahn A J (1975) Changes in ethanol consumption by C3H and CF1 mice with age. *J Stud Alcohol* 36: 1107-1123
- 122 — Kalant H, Woo N (1981) Electrophysiological effects of ethanol on the nervous system. *Pharmac Ther* 14: 431-457
- 123 — Karoly A J, Winger G, Ikomi F, Woods J H (1978) The reinforcing property of ethanol in the rhesus monkey. II. Some variables related to the maintenance of intravenous-reinforced responding. *Psychopharmacol* 58: 19-25
- 124 — 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 Path* 18: 127-135
- 125 — Kiraly E, Jones D G (1982) Dendritic spine changes in rat hippocampal pyramidal cells after postnatal lead treatment: a Golgi study. *Exp Neurol* 77: 236-239

- 126 — Kognismark B W (1970) Methods for counting neurons. Em: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Ed: W J H Nauta, S O E Ebbesson. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 315-340
- 127 — Landis D M D, Reese T S (1983) Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J Cell Biol* 97: 1169-1178
- 128 — Lange W (1982) Regional differences in the cytoarchitecture of the cerebellar cortex. Em: The Cerebellum — New Vistas. Ed: S L Palay, V Chan-Palay. *Exp Brain Res Suppl* 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 93-107
- 129 — Larsell O (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 97: 281-356
- 130 — Lee K, Dunwiddie T, Dietrich R, Lynch G, Hoffer B (1981) Chronic ethanol consumption and hippocampal neuron dendritic spines: a morphometric and physiological analysis. *Exp Neurol* 71: 541-549
- 131 — Leigh A D, Meyer A (1949) Degeneration of the granular layer of the cerebellum. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 12: 287-296
- 132 — Lester D, Freed E X (1973) Criteria for an animal model of alcoholism. *Pharmacol Biochem Behav* 1: 103-107
- 133 — Lieber C S (1973) Hepatic and metabolic effects of alcohol (1966 to 1973). *Gastroenterology* 65: 821-846
- 134 — Lieber C S (1977) Pathogenesis of alcoholic liver disease: an overview. Em: Alcohol and the Liver V 3. Ed: M M Fisher, J G Rankin. Plenum Press, New York. 197-255
- 135 — Lieber C S (1982) Metabolism of ethanol. Em: Medical Disorders of Alcoholism: Pathogenesis and Treatment. V XXII. Major Problems in Internal Medicine. Ed: L H Smith Jr. Saunders Company W B, Philadelphia. 1-64
- 136 — 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
- 137 — Lieber C S, Leo M A (1982) Alcohol and the liver. Em: Medical Disorders of Alcoholism: Pathogenesis and Treatment V XXII Major Problems in Internal Medicine. Ed: L H Smith Jr. Saunders Company, W B, Philadelphia. 259-312

- 138 — Lieber C S, Schenker S (1982) Effects of alcohol on the brain: clinical features, pathogenesis and treatment. Em: *Medical Disorders of Alcoholism: Pathogenesis and Treatment V XXII Major Problems in Internal Medicine*. Ed: L H Smith Jr. Saunders Company, W B, Philadelphia. 480-525
- 139 — 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 Ass Amer Phys* 76: 289-300
- 140 — Lishman W A (1981) Cerebral disorder in alcoholism: syndromes of impairment. *Brain* 104: 1-20
- 141 — Liss L (1982) Cerebellar neuritic plaques in dementia Alzheimer's type. *J Neuropathol Exp Neurol (Abs)* 41: 379
- 142 — Llinás R (1982) General discussion: radial connectivity in the cerebellar cortex: a novel view regarding the functional organization of the molecular layer. Em: *The Cerebellum — New Vistas*. Ed: S L Palay, V Chan-Palay. *Exp Brain Res Suppl* 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 189-194
- 143 — Llinás R, Hillman D E, Precht W (1973) Neuronal circuit reorganization in mammalian agranular cerebellar cortex. *J Neurobiol* 4: 69-94
- 144 — Lynch M J G (1960) Brain lesions in chronic alcoholism. *A M Arch Pathol* 69: 342-353
- 145 — Machado-Salas J P, Scheibel A B (1979) Limbic system of the aged mouse. *Exp Neurol* 63: 347-355
- 146 — Mann D M, Yates P O, Stamp J E (1978) The relationship between lipofuscin pigment and ageing in the human nervous system. *J Neurol Sci* 37: 83-93
- 147 — Marr D (1969) A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202: 437-470
- 148 — Matthews M R, Powell T P S (1962) Some observations on trans-neuronal cell degeneration in the olfactory bulb of the rabbit. *J Anat* 96: 89-102
- 149 — Mayhew T M (1979) Stereological approach to the study of synapse morphometry with particular regard to estimating number in a volume and on a surface. *J Neurocytol* 8: 121-138
- 150 — McClearn G E, Rodgers D A (1961) Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. *J Comp Physiol Psychol* 54: 116-119

- 151 — 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
- 152 — McWilliams J R, Lynch G (1981) Sprouting in the hippocampus is accompanied by an increase in coated vesicles. *Brain Res* 211: 158-164
- 153 — McWilliams R, Lynch G (1978) Terminal proliferation and synaptogenesis following partial deafferentation: the reinnervation of the inner molecular layer of the dentate gyrus following removal of its commissural afferents. *J Comp Neurol* 180: 581-616
- 154 — Meish R A (1982) Animal studies of alcohol intake. *Brit J Psychiat* 141: 113-120
- 155 — Mendelson J H, Mello N K (1979) The diagnosis of alcoholism. Em: *The Diagnosis & Treatment of Alcoholism*. Ed: J H Mendelson, N K Mello. McGraw-Hill, New York. 2-18
- 156 — Mervis R (1981) Cytomorphological alterations in the aging animal brain with emphasis on Golgi studies. Em: *Aging and Cell Structure V 1*. Ed: J E Johnson Jr. Plenum Press, New York. 143-186
- 157 — Miller S S, Goldman M E, Erickson C K, Shorey R L (1980) Induction of physical dependence on and tolerance to ethanol in rats fed a new nutritionally complete and balanced liquid diet. *Psychopharm* 68: 55-59
- 158 — Morgan M Y, Sherlock S (1977) Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. *Br Med J* 1: 939-941
- 159 — Müller L J (1983) Postnatal development of synaptic contacts in the visual cortex of rabbits. Tese de Doutorado. Universidade de Amsterdam
- 160 — Müller L J, Verwer R W H, Nunes-Cardozo 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
- 161 — Müller U, Heinsen H (1984) Regional differences in the ultrastructure of Furkinje cells of the rat. *Cell Tiss Res* 235: 91-98
- 162 — Murray R M, Gurling H M D (1980) Genetic contributions to normal and abnormal drinking. Em: *Psychopharmacology of Alcohol*. Ed: M Sandler. Raven Press, New York. 89-105

- 163 — Nachman M, Lester D, LeMagen J (1970) Alcohol aversion in the rat: behavioral assessment of noxious drug effects. *Science* 168: 1244-1246
- 164 — Neubuerger K T (1957) The changing neuropathologic picture of chronic alcoholism. Prevailing involvement of the cerebellar granular layer. *AMA Arch Pathol* 63: 1-6
- 165 — Novikoff A B (1967) Lysosomes in nerve cells. *Em: The Neuron*. Ed: H Hydén. Elsevier, Amsterdam. 319-377
- 166 — 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
- 167 — Olson L, Fuxe K (1971) On the projections from the locus coeruleus noradrenaline neurons: the cerebellar innervation. *Brain Res* 28: 165-171
- 168 — Palay S L, Chan-Palay V (1974) *Cerebellar Cortex: Cytology and Organization*. Springer-Verlag, Berlin
- 169 — Pappas G D, Waxman S G (1972) Synaptic fine structure-morphological correlates of chemical and electrotonic transmission. *Em: Structure and Function of Synapses*. Ed: G D Pappas, D P Purpura. Raven Press, New York. 1-43
- 170 — Parsons O A (1977) Neuropsychological deficits in alcoholics: facts and fancies. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1: 51-56
- 171 — Paula-Barbosa M M (1977) Terminais Musgosos do Cerebelo (Estudo Ultrastrutural). Tese de Doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
- 172 — Paula-Barbosa M M, Sobrinho-Simões M A (1977) An ultrastructural morphometric study of mossy fiber endings in Pigeon, Rat and Man. *J Comp Neurol* 170: 365-380
- 173 — Paula-Barbosa M M, Tavares M A (1984) Envelhecimento neuronal precoce no alcoolismo crónico. Estudo morfológico experimental. 1.º Prémio Pfizer Investigação Científica
- 174 — Paula-Barbosa M M, Tavares M A (1985) Long-term alcohol consumption induces microtubular changes in the adult rat cerebellar cortex. Aceite para publicação. *Brain Res*
- 175 — Paula-Barbosa M M, Mota-Cardoso R, 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

- 176 — Paula-Barbosa M M, Ruela C, Faria R, Cruz C (1980) Cerebral cortex dendritic degeneration in subacute sclerosing panencephalities (SSPE) *Neurology (Minneapolis)* 30: 7-11
- 177 — 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
- 178 — Paula-Barbosa M M, Ruela C, Tavares M A, Pontes C, Saraiva A, Cruz C (1983) Cerebellar cortex ultrastructure in ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol* 13: 297-302
- 179 — 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 a combined Golgi-electron microscopical study. *J Anat* 137: 757-764
- 180 — 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
- 181 — Peachey L D (1958) Thin sections: I — A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 233-242
- 182 — Pentney R (1982) Age and ethanol-associated changes in cerebellar Purkinje cells. Em: *Alcoholism and Aging: Advances in Research* Ed: W G Wood, M F Elias. C R C Press Inc, Boca Raton. 149-169
- 183 — Peters A, Vaughan D W (1981) Central nervous system. Em: *Aging and Cell Structure V 1*. Ed: J E Johnson Jr. Plenum Press, New York. 1-34
- 184 — 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
- 185 — 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
- 186 — 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
- 187 — Pontes C, Gonçalves V, Paula-Barbosa M M (1983) Degeneração selectiva da camada granular do cerebello. Estudo necrópsico de um caso. *J Médico* 111: 471-474

- 188 — Pro J D, Smith M C H, Sumi S M (1980) Presenile Alzheimer's disease: amyloid plaques in the cerebellum. *Neurology* 30: 820-825
- 189 — Pysh J J, Perkins R E, Beck L S (1979) The effect of postnatal undernutrition on the development of the mouse Purkinje cell dendritic tree. *Brain Res* 163: 165-170
- 190 — Raisman G, Field P M (1973) A quantitative investigation of the development of collateral reinnervation after partial deafferentation of the septal nuclei. *Brain Res* 50: 241-264
- 191 — Rakic P (1972) Extrinsic cytological determinants of basket and stellate cell dendritic pattern in the cerebellar molecular layer. *J Comp Neurol* 146: 335-354
- 192 — Rakic P, Sidman R L (1973) Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice. *J Comp Neurol* 152: 133-162
- 193 — Rall W (1974) Dendritic spines, synaptic potency and neuronal plasticity. Em: Cellular Mechanisms Subservng Changes in Neuronal Activity. Ed: C D Woody, K A Brown, T J Crow, J D Knispel. Brain Information Service-Research Report 3. Univ California Los Angeles. 13-21
- 194 — Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés* V 2. Madrid. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas. 1-106
- 195 — Redmond P G, Cohen G (1972) Sex-difference in acetaldehyde exhalation following ethanol administration in C57 BL mice. *Nature* 236: 117-119
- 196 — Reichel W, Höllander J, Clark J H, Strehler B L (1968) Lipofuscin pigment as a function of age and distribution in rodent brain. *J Gerontol* 23: 71-78
- 197 — Reynolds E S (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
- 198 — 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
- 199 — Richter C P (1941) Alcohol as a food. *Q J Stud Alcohol* 1: 650-662
- 200 — Richter C P, Campbell K H (1940) Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science* 91: 507-508

- 201 — Riley J N (1977) Alterations in dendritic morphology following chronic alcohol consumption: a Golgi analysis. Tese de Doutorado. Universidade da Florida
- 202 — Riley J N, Walker D W (1978) Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science* 201: 646-648
- 203 — Rodgers D A, McClearn G E (1962) Mouse strain differences in preference for various concentrations of alcohol. *Q J Stud Alcohol* 23: 26-33
- 204 — Rogers J, Siggins G R, Schulman J A, Bloom F E (1980) Physiological correlates of ethanol intoxication, tolerance and dependence in rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Res* 196: 183-198
- 205 — Rogers J, Silver M A, Shoemaker W J, Bloom F E (1980) Senescent changes in a neurobiological model system: cerebellar Purkinje cell electrophysiology and correlative anatomy. *Neurobiol Aging* 1: 3-11
- 206 — Rogers J, Wiener S G, Bloom F E (1979) Long-term ethanol administration methods for rats: advantages of inhalation over intubation or liquid diets. *Behav Neur Biol* 27: 466-486
- 207 — Romano J, Michael M, Merritt H (1940) Alcoholic cerebellar degeneration. *Arch Neurol Psychiat* 44: 1230-1236
- 208 — Rubin E, Beattie D S, Toth A, Lieber C S (1972) Structural and functional effects of ethanol on hepatic mitochondria. *Fed Proc* 31: 131-140
- 209 — 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
- 210 — 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
- 211 — Ryan C, Butters N (1980) Learning and memory impairments in young and old alcoholics. Evidence for premature aging hypothesis. *Alcoholism: Clin Exp Res* 4: 288-293
- 212 — 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

- 213 — Salaspuro M P, Lieber C S (1980) Comparison of the detrimental effects of chronic alcohol intake in humans and animals. Em: *Animal Models in Alcohol Research*. Ed: K Eriksson, J D Sinclair, K Kilianmaa. Academic Press, London. 359-376
- 214 — Saltykov S A. Citado por Underwood E E (1970) *Quantitative Stereology*. Addison-Wesley Publishing Company Reading, Massachusetts, Menlo Park, California, London, Don Mills, Ontario
- 215 — Samorajski T, Ordy J M, Rady-Reimer P (1968) Lipofuscin pigment accumulation in the nervous system of aging mice. *Anat Rec* 160: 555-574
- 216 — Samson H H, Diaz J (1980) Effect of neonatal ethanol exposure on brain development in rodents. Em: *Fetal Alcohol Syndrome: Animal Studies V III*. Ed: E L Abel. C R C Press, Boca Raton. 131-150
- 217 — Saragoça A, Moreira M L, Novais L, Vilar D, Silva S H, Baptista A S (1981) Liver injury in chronic alcoholism: clinical laboratory and histological correlation. *Acta Med Port Suppl* 2: 65-74
- 218 — Scheibel A B, Tomiyasu U (1978) Dendritic sprouting in Alzheimer's presenile dementia. *Exp Neurol* 60: 1-8
- 219 — Scheibel M E, Scheibel A B (1978) *The methods of Golgi*. Em: *Neuroanatomical Research Techniques*. Ed: R T Robertson. Academic Press, New York. 89-114
- 220 — Schulman J A (1983) Chemical neuroanatomy of the cerebellar cortex. Em: *Chemical Neuroanatomy*. Ed: P C Emson. Raven Press, New York. 209-228
- 221 — Sekhon S S, Maxwell D S (1974) Ultrastructural changes in neurons of the spinal anterior horn of ageing mice with particular reference to the accumulation of lipofuscin pigment. *J Neurocytol* 3: 59-72
- 222 — Shelanski M L, Feit H (1972) Filaments and tubules in the nervous system. Em: *The Structure and Function of Nervous Tissue, VI (Structure IV and Physiology IV)* Ed: G H Bourne, Academic Press, New York, London. 47-80
- 223 — Sholl D A (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87: 387-407
- 224 — Sinclair J G, Lo G F (1982) Ethanol effects on rat cerebellar Purkinje cells. *Gen Pharmac* 13: 449-451
- 225 — Sinclair J G, Lo G F, Harris D P (1982) Ethanol effects on the olivocerebellar system. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 610-614

- 226 — Sinclair J G, Lo G F, Harris D P (1983) Ethanol inhibits inferior olive neurons. *Proc West Pharmacol Soc* 26: 155-156
- 227 — 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
- 228 — Sobell M B (1981) The nature of alcohol problems: old concepts and new. *Prog Neuro Psychopharmacol* 5: 475-481
- 229 — Sotelo C (1973) Permanence and fate of paramembranous synaptic specializations in «mutants» and experimental animals. *Brain Res* 62: 345-351
- 230 — Sotelo C (1975) Dendritic abnormalities of Purkinje cells in the cerebellum of neurologic mutant mice (weaver and staggerer). *Em: Advances in Neurology V 12: Physiology and Pathology of Dendrites*. Ed: G W Kreutzberg. Raven Press, New York. 335-351
- 231 — Sotelo C (1975) Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice. II. Morphological study of cerebellar cortical neurons and circuitry in the weaver mouse. *Brain Res* 94: 19-44
- 232 — Sotelo C (1978) Purkinje cell ontogeny: Formation and maintenance of spines. *Em: Prog Brain Res V 48: Maturation of the Nervous System*. Ed: M A Corner, R E Baker, N E Van de Pol, D F Swaab, H B M Uylings. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. 149-170
- 233 — Sotelo C (1980) Mutant mice and the formation of cerebellar circuitry. *Trends NeuroSci* 3: 33-35
- 234 — Sotelo C (1982) Synaptic remodeling in agranular cerebella. *Em: The Cerebellum — New Vistas*. Ed: S L Palay, V Chan-Palay. *Exp Brain Res Suppl* 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 50-68
- 235 — Sotelo C, Privat A (1978) Synaptic remodeling of the cerebellar circuitry in mutant mice and experimental cerebellar malformations. Study «in vivo» and «in vitro». *Acta Neuropathol (Berl)* 43: 19-34
- 236 — Sotelo C, Triller A (1979) Fate of presynaptic afferents to Purkinje cells in the adult nervous mutant mouse: a model to study presynaptic stabilization. *Brain Res* 175: 11-36
- 237 — Sotelo C, Hillman D E, Zamora A J, Llinás R (1975) Climbing fiber deafferentation: Its action on Purkinje cell dendritic spines. *Brain Res* 98: 574-581

- 238 — Spacek J, Parizek J, Lieberman A R (1973) Golgi cells, granule cells and synaptic glomeruli in the molecular layer of the rabbit cerebellar cortex. *J Neurocytol* 2: 407-428
- 239 — Sterio D C (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134: 127-136
- 240 — Steward O, Vinsant S L (1983) The process of reinnervation in the dentate gyrus of the adult rat: a quantitative electron microscopic analysis of terminal proliferation and reactive synaptogenesis. *J Comp Neurol* 214: 370-386
- 241 — Stowell R E (1941) Effect on tissue volume of various methods of fixation, dehydration and embedding. *Stain Tech* 16: 67-83 citado em 126
- 242 — Swindale N V (1981) Dendritic spines only connect. *Trends NeuroSci* 4: 240-241
- 243 — Tabakoff B, Anderson R A, Ritzmann R F (1976) Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Bioch Pharmacol* 25: 1305-1309
- 244 — Tabakoff B, Noble E P, Warren K R (1979) Alcohol, nutrition and the brain. Em: *Nutrition and the Brain V 4*. Ed: R J Wurtman, J J Wurtman. Raven Press. New York. 159-213
- 245 — Tavares M A, Paula-Barbosa M M (1981) Cerebellar intranuclear inclusions in chronically alcoholized rats. *Cell Tiss Res* 216: 227-230
- 246 — 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
- 247 — Tavares M A, Paula-Barbosa M M (1982) Alterações neuronais do córtex cerebral no alcoolismo crônico. Estudo com o método de Golgi em material de autópsia. *O Médico* 102: 107-113
- 248 — 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
- 249 — 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
- 250 — Tavares M A, Paula-Barbosa M M, Gray E G (1983) Dendritic spine plasticity and chronic alcoholism in rats. *Neurosc Lett* 42: 235-238

- 251 — 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
- 252 — Terry R D (1978) Aging, senile dementia and Alzheimer disease. Em: *Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders* (Aging V 7). Ed: R Katzman, R D Terry, K L Bick. Raven Press, New York. 11-14
- 253 — Terry R D (1978) Senile dementia. *Fed Proc* 37: 2837-2840
- 254 — Terry R D, Wisniewski H M (1970) The ultrastructure of the neurofibrillary tangle and the senile plaque. Em: *Alzheimer's Disease and Related Conditions*. Ed: G E W Wolstenholme, M O'Connor. J & Churchill, London. 145-165
- 255 — Tewari S, Noble E P (1971) Ethanol and brain protein synthesis. *Brain Res* 26: 469-474
- 256 — Tewari S, Noble E P (1979) Effects of ethanol on cerebral protein and ribonucleic acid synthesis. Em: *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol V I*. Ed: E Majchrowicz, E P Noble. Plenum Press, New York, London. 541-548
- 257 — Tombaugh T N, Tombaugh J W (1981) Ethanol-Metrecal diets: I. Effects of different levels of ethanol-derived kilocalories on consumption of diet, body weight and grams of ethanol ingested. *Pharm Biochem Behav* 15: 455-462
- 258 — Uchizono K (1965) Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature (Lond)* 207: 642-643
- 259 — Uylings H B M, Smit G J, Veltman W A M (1975) Ordering methods in quantitative analysis of branching structures of dendritic trees. Em: *Advances in Neurology V 12: Physiology and Pathology of Dendrites*. Ed: G W Kreutzberg. Raven Press, New York. 247-254
- 260 — Valverde F (1970) The Golgi method. A tool for comparative structural analyses. Em: *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. Ed: W J H Nauta, S O E Ebbesson. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 12-31
- 261 — 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. *Develop Brain Res* 12: 146-153
- 262 — Verwer R W H, De Groot D M G (1982) The effect of shape assumptions on the estimation of the numerical density of synapses from thin sections. Em: *Prog Brain Res V 55: Chemical Transmission in the Brain*. Ed: R M Buijjs, P Pévet, D F Swaab. Elsevier Biomedical Press. 195-203

- 263 — Verwer R W H, Van Pelt J (1983) A new method for the topological analysis of neuronal tree structures. *J Neurosc Meth* 8: 335-351
- 264 — 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
- 265 — Victor M, Banker B Q (1978) Alcohol and dementia. Em: *Alzheimer's Disease: Senile Dementia and Related Disorders (Aging V 7)*. Ed: R Katzman, R D Terry, K L Bick. Raven Press, New York. 149-172
- 266 — Victor M, Adams R D, Mancall E L (1959) A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. *Arch Neurol* 1: 579-688
- 267 — Volk B (1984) Neurohistological and neurobiological aspects of fetal alcohol syndrome in the rat. Em: *Neurobehavioral Teratology*. Ed: J Yanai. Elsevier. Science Publish. 163-193
- 268 — Von-Wartburg J P (1980) Comparison of alcohol metabolism in humans and animals. Em: *Animal Models in Alcohol Research*. Ed: K Eriksson, J O Sinclair, K Kiianmaa. Academic Press, London. 427-443
- 269 — Vrensen G, Nunes 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
- 270 — Walker D W, Freund G (1971) Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. *Physiol Behav* 7: 773-778
- 271 — Walker D W, Hunter B E (1978) Short-term memory impairment following chronic alcohol consumption in rats. *Neuropsychol* 16: 545-553
- 272 — Walker D W, Barnes D E, Riley J N, Hunter B E, Zornetzer S F (1980) Neurotoxicity of chronic alcohol consumption: an animal model. Em: *Psychopharmacology of Alcohol*. Ed: M Sandler. Raven Press, New York. 17-31
- 273 — 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
- 274 — 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

- 275 — 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. Em: Cerebral Deficits in Alcoholism. Ed: D A Wilkinson. Addiction Research Foundation, Toronto. 123-147
- 276 — Wallgren H, Forsander O (1963) Effect of adaptation to alcohol and of age on voluntary consumption of alcohol by rats. *Br J Nutr* 17: 453-457
- 277 — Wang J, Marvin M, Abel B, Pierson Jr R N (1976) Effects of chronic alcohol exposure on growth and nutrition in rats. *Ann NY Acad Sci* 273: 205-211
- 278 — Weibel E R (1979) Stereological Methods V 1: Practical Methods for Biological Morphometry. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco
- 279 — Weibel E R, Bolender R P (1973) Stereological techniques for electron microscopic morphometry. Em: Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications V 3. Ed: M A Hayat. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 239-296
- 280 — 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
- 281 — Werner T E, Smith S G, Davies W M (1977) Intra-gastric self-administration of alcohol by rats: a dose-effect comparison. *Physiol Behav* 5: 453-454
- 282 — West M J, Danscher G, Gydesen H (1978) A determination of the volumes of the layers of the rat hippocampal region. *Cell Tiss Res* 188: 345-359
- 283 — Whalley L J (1980) Social and biological variables in alcoholism: a selective review. Em: Psychopharmacology of Alcohol. Ed: M Sandler. Raven Press, New York. 1-15
- 284 — Wilkinson D A, Carlen P L (1982) Morphological abnormalities in the brain of alcoholics: relationship to age, psychological test scores and patient type. Em: Alcoholism and Aging: Advances in Research. Ed: W G Wood, M F Elias. C R C Press, Inc, Boca Raton. 61-77
- 285 — Wilkinson P, Santa Maria J N, Rankin J G (1969) Epidemiology of alcoholic cirrhosis. *Austral Ann Med* 18: 222-226
- 286 — Williams R S, Ferrante R J, Caviness Jr V S (1978) The Golgi rapid method in clinical neuropathology: The morphologic consequences of suboptimal fixation. *J Neuropathol Exp Neurol* 37: 13-33

- 287 — Wilson L, Sotelo C, Caviness Jr V S (1981) Heterologous synapses upon Purkinje cells in the cerebellum of the reeler mutant mouse: an experimental light and electron microscopic study. *Brain Res* 213: 63-82
- 288 — Wisniewski H M, Terry R D (1970) An experimental approach to the morphogenesis of neurofibrillary degeneration and the argyrophilic plaque. Em: *Alzheimer's Disease and Related Conditions*. Ed: G E W Wolstenholme, M O'Connor. J & A Churchill, London. 223-240
- 289 — Wisniewski H M, Ghetti B, Terry R D (1973) Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged rhesus monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol* 32: 566-584
- 290 — Wisniewski H M, Bruce M E, Fraser H (1975) Infectious etiology of neuritic (senile) plaques in mice. *Science* 190: 1108-1110
- 291 — Wisniewski H M, Moretz R C, Lossinsky A S (1981) Evidence for induction of localized amyloid deposits and neuritic plaques by an infectious agent. *Ann Neurol* 10: 517-522
- 292 — Wisniewski H M, Sinatra R S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1981) Neurofibrillary and synaptic pathology in the aged brain. Em: *Aging and Cell Structure V I*. Ed: J E Johnson Jr. Plenum Press, New York, London. 105-142
- 293 — Wood W G (1976) Age-associated differences in response to alcohol in rats and mice: a biochemical and behavioral review. *Exp Aging Res* 2: 543-562
- 294 — Wood W G (1980) Aging and alcoholism: the need for an animal model. Em: *Animal Models in Alcohol Research*. Ed: K Eriksson, J D Sinclair, K Kiiianmaa. Academic Press, London. 81-84
- 295 — Wood W G, Armbrrecht H J (1982) Behavioral effects of ethanol in animals: age differences and age changes. *Alcoholism: Clin Exp Res* 6: 3-12
- 296 — Yamada K M, Spooner B S, Wessels N K (1971) Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J Cell Biol* 49: 614-635
- 297 — 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

Trabalho, desde o início das actividades da linha de investigação que levaram à elaboração da presente dissertação de doutoramento, sob a orientação científica do Professor M. M. Paula-Barbosa. As irrefutáveis provas de amizade e as directrizes, conselhos e encorajamentos que recebi não diferiram das que sempre me dispensou na elaboração de outros trabalhos. Por isso, o meu reconhecimento.

Agradeço também ao Exmo. Senhor Professor Abel Sampaio Tavares, que em 1977 me convidou para integrar a sua equipa docente, tudo quanto desde então com ele aprendi. Testemunho-lhe ainda a minha gratidão pelo interesse e cuidado com que acompanhou a parte final da elaboração desta dissertação.

Ao Exmo. Senhor Professor J. Pinto-Machado, com quem iniciei a minha actividade científica, muito agradeço o apoio sempre manifestado às minhas actividades pedagógicas e de investigação.

Agradeço aos Professores M. A. Sobrinho-Simões e Joaquim Maia, a preciosa ajuda que me prestaram no desenvolvimento dos métodos morfométricos e estatísticos utilizados.

A personalidade do Professor George Gray, com quem trabalhei nos últimos anos, muito contribuiu também para modelar a minha actividade profissional. Agradeço ao Professor Ronald Verwer a sua ajuda ao efectuar, no Netherlands Institute for Brain Research, parte dos cálculos sinaptológicos apresentados. E ao Dr. Miguel Pereira as determinações das alcoolémias.

A amizade e disponibilidade demonstradas pelo João Nuno Tavares e Maria Dulce Madeira foram uma inestimável ajuda para a conclusão deste trabalho.

Agradeço ainda os subsídios das Fundações «Calouste Gulbenkian» e «Volkswagen» para a elaboração e publicação deste trabalho.

Aos meus pais agradeço quanto lhes devo, pelo apoio incondicional que sempre me deram.

Por último, não posso esquecer todos quantos trabalham no Instituto de Anatomia e ainda os que de algum modo, directa ou indirectamente, me auxiliaram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E METODOS	25
1. Animais e Dietas	25
2. Técnica de Perfusão, Distribuição Geral e Tratamento do Material	26
3. Estudos Quantitativos	29
4. Análise Estatística dos Resultados	41
RESULTADOS	43
1. Animais e Dietas	43
2. Volumes das Camadas do Cerebelo	44
3. Número de Células do Córtex Cerebeloso	46
4. Aferências Corticais Cerebelosas	53
5. Células Granulares	56
6. Organização Estrutural do Neurópilo da Camada Granular (Glomérulo Cerebeloso)	58
7. Árvores Dendríticas das Células de Purkinje	66
8. Árvores Dendríticas dos Interneurónios — Células de Golgi, Células em Cesto e Células Estreladas	70
9. Organização Estrutural do Neurópilo da Camada Molecular	71
10. Axónios das Células de Purkinje	82
DISCUSSÃO	87
RESUMO E CONCLUSÕES	129
SUMMARY AND CONCLUSIONS	133
BIBLIOGRAFIA	137

