

# ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DO BULBO OLFATÓRIO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AGUDA COM ETANOL

## IMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE OLFATORY BULB IN WISTAR RATS SUBMITTED TO ACUTE PRENATAL EXPOSURE TO ETHANOL

Tales Alexandre AVERSI-FERREIRA<sup>1</sup>; Humberto Gabriel RODRIGUES<sup>2</sup>; Alessandro Camilo NERES<sup>2</sup>; Lubia Cristina FONSECA<sup>2</sup>; Nilson PENHA-SILVA<sup>3</sup>

**RESUMO:** Os efeitos do uso crônico de etanol durante a gravidez sobre a morfologia e as funções do sistema neural são conhecidos na literatura, mas os efeitos do uso agudo de etanol em momentos críticos da gravidez ainda precisam ser esclarecidos. A exposição pré-natal crônica ao etanol tem sido associada a várias anormalidades em fetos e neonatos, como alterações na densidade neuronal e heterotopia de neurônios da zona sub-ventricular do telencéfalo, no bulbo olfatório. Neste trabalho nós estudamos os efeitos da utilização pré-natal aguda de etanol (3 doses de 3 g/kg de peso corporal) no décimo-segundo dia de vida intrauterina (E<sub>12</sub>) sobre a morfologia do bulbo olfatório de ratos Wistar no oitavo dia de vida pós-uterina (P<sub>8</sub>), quando as células na fase de síntese foram marcadas *in vivo* com bromodesoxiuridina e os animais foram sacrificados para observação. Os bulbos olfatórios apresentaram uma diminuição significativa na densidade neuronal, como também é observado na síndrome alcoólica fetal decorrente da exposição materna crônica ao etanol durante a gravidez. Estes efeitos poderiam justificar problemas na sensibilidade olfatória de neonatos cujas mães sofreram exposição aguda ao etanol durante a gravidez.

**UNITERMOS:** Bulbo olfatório; Etanol; Neurônio; Síndrome alcoólica fetal; Toxicidade aguda.

## INTRODUÇÃO

Os bulbos olfatórios são um par de pequenas estruturas telencefálicas altamente laminadas, situadas na face anterior do lobo frontal, imediatamente acima da placa crivosa do osso etmóide. Eles recebem uma grande variedade de informações oriundas de moléculas de odor, captadas por receptores da área olfatória do nariz, e as redirecionam para o neocórtex, sendo indispensáveis para a busca de alimentação e reprodução animal (MORI; NAGAO; YOSHIHARA, 1999; FUJISAKI et al., 2004).

O sistema olfatório é um modelo extraordinário para a investigação da guia e da conectividade do crescimento axonal. Durante o desenvolvimento, o epitélio olfatório, o bulbo olfatório e o córtex olfatório diferenciam diversos tipos celulares, entre os estágios embrionários E<sub>9</sub> e E<sub>11</sub>, e estendem suas projeções axonais no intervalo neurogenético que vai do estágio embrionário E<sub>11</sub> até E<sub>16</sub> (LÓPEZ-MASCARAQUE; CASTRO, 2004).

Na estrutura histológica do bulbo olfatório, há cinco camadas que circundam uma região central de substância branca, formada pelos axônios das fibras que saem do bulbo olfatório e os que chegam ao bulbo olfatório a partir de outras regiões do sistema neural central (BURT, 1993).

Os axônios dos nervos olfatórios espalham-se sobre a superfície olfatória ipsilateral e formam a camada neural mais superficial, a camada do nervo olfatório. Essas fibras aferentes primárias terminam em pequenos aglomerados esféricos de neurópila, os glomérulos. Nos glomérulos, os axônios do nervo olfatório fazem sinapses tanto com interneurônios como com os principais neurônios retransmissores do bulbo olfatório (células mitrales e em tufo).

Logo abaixo da camada do nervo olfatório há a camada glomerular, que contém, além dos glomérulos, os corpos celulares das células em tufo externas e pequenos interneurônios, as células periglomerulares (DOETSCH; ALVAREZ-BUYLLA, 1996).

<sup>1</sup> Professor titular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIMONTES

<sup>2</sup> Pesquisadores associados ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia

<sup>3</sup> Professor titular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia

Received: 31/01/05

Accepted: 21/06/05

A camada plexiforme externa, adjacente à camada glomerular, é uma camada relativamente espessa de neurópila, contendo os corpos celulares esparsos de células intermediárias em tufo (PIERRE-MARIE; SAGHATELYAN; LEMASSON, 2004).

A camada de células mitrais forma uma lâmina profunda, delgada e compacta, contendo os corpos celulares das células mitrais (MARGRIE; SAKMANN; URBAN, 2001).

Abaixo da camada de células mitrais encontra-se a camada plexiforme interna ou camada de células granulares, a mais profunda, que possui neurópila densa, contendo os corpos celulares das células granulares que provém da porção anterior da zona subventricular telencefálica neonatal (BURT, 1993; PIERRE-MARIE; SAGHATELYAN; LEMASSON, 2004).

O bulbo olfatório é uma das poucas estruturas do sistema neural de mamíferos, inclusive humanos (BEDARD; PARENT, 2004), em que há contínua geração de neurônios. Essas células, originadas na zona ventricular e subventricular dos ventrículos laterais do telencéfalo, migram para o bulbo olfatório através de uma rota tangencial, a rota rostral (GHEUSI *et al.*, 2000; SAGHATELYAN *et al.*, 2003; VICARIO-ABEJÓN *et al.*, 2003).

O mecanismo molecular dessa migração é pouco conhecido (KORNBLUM *et al.*, 1997). As conseqüências funcionais desta geração permanente e a integração de novos circuitos de neurônios, também são desconhecidas (BEDARD; PARENT, 2004; GHEUSI *et al.*, 2000).

A gênese dos neurônios sensoriais olfativos (NOS) ocorre em torno de  $E_9$  e  $E_{9,5}$ , a de células mitrais próximo de  $E_{11}$  e a do córtex olfatório próximo de  $E_{10}$ .

A formação dos axônios das células mitrais ocorre em torno de  $E_{11,5}$ , iniciando-se antes da chegada de axônios de neurônios olfativos na superfície telencefálica ( $E_{12}$ ). As células mitrais começam a emitir dendritos no momento em que os primeiros axônios sensoriais penetram no bulbo ( $E_{13,5}$ ) (LÓPEZ-MASCARAQUE; CASTRO, 2004.).

É possível que essa constante neurogênese dê suporte aos processos de discriminação de odores e mantenha a memória olfativa de ratos. Essa constante adição ou substituição de neurônios no bulbo olfatório adulto pode implicar em uma função olfatória melhorada (LEE *et al.*, 2003).

O movimento coordenado dos neuroblastos é conseqüência de montagem e desmontagem do citoesqueleto (MILLER, 1993), e depende da glia radial para chegar a seu destino nas camadas do neocórtex

(GELOT; ESPERANDIEU; POMPIDOU, 1998; MAEDA; NODA, 1998; SUPER; SORIANO; UYLINGS, 1998). Desarranjos relatados pelo etanol em eventos de astrogliogênese podem induzir a distúrbios na interação neuronal-gliar e também contribuir para anormalidades no sistema olfatório (BARRON; RILEY, 1992; CHEN; PARNELL; WEST, 1999; MORROW; KIEFER; METZLER, 1993).

O etanol causa danos nos órgãos em geral e particularmente nos neurônios adultos ou em desenvolvimento (SHETTY; BURROWS; PHILLIPS, 1993). Nas células, ele rompe as montagens dos elementos contráteis do citoesqueleto no músculo cardíaco e na crista neural (MILLER, 1993).

Estudos recentes demonstram que mesmo a exposição pré-natal aguda ao etanol tem sido associada a várias anormalidades em fetos e descendentes. No córtex pré-frontal a exposição aguda ao etanol provoca heterotopia de neurônios da zona sub-ventricular na rota tangencial para o bulbo olfatório, causando mudanças na densidade neuronal (FERREIRA *et al.*, 2004).

O objetivo do presente estudo foi determinar a densidade neuronal do bulbo olfatório de ratos após a injeção intraperitoneal de etanol, no décimo segundo dia de vida intrauterina ( $E_{12}$ ), no momento em que os axônios dos NOS estão se alongando, após a gênese dos NOS ( $E_9$ ) e das células mitrais ( $E_{11}$ ), mas antes da emissão dendrítica das células mitrais e da chegada dos axônios dos NOS ao bulbo ( $E_{13,5}$ ). Como o estabelecimento de conexões sinápticas entre os neurônios é fundamental para sua sobrevivência, prejuízos na elongação poderiam afetar a densidade neuronal do bulbo, principalmente das células mitrais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas de ratos Wistar dos grupos controle e experimental, com pesos corporais variando entre 180 e 230 g, foram engaioladas durante a noite com ratos machos para procriação. A presença de secreções vaginais com espermatozoides foi usada para caracterizar o dia 1 da gestação ( $E_1$ ). Dezoito fêmeas grávidas de ratos Wistar foram então alojadas em gaiolas mantidas a  $22 \pm 0,4$  °C, com ciclos de luz e escuridão alternados com 12 horas cada, e continuamente abastecidas com alimento e água. Em  $E_{12}$ , 12 animais receberam injeções intraperitoneais de uma solução de etanol a 20% (3 g/kg de peso corporal), por três vezes, com intervalos de 8 horas entre cada administração. Também em  $E_{12}$ , 6 fêmeas grávidas do grupo controle receberam injeções intraperitoneais de solução salina a 0,9%, também por 3

vezes, com 8 horas de intervalo entre cada administração. Para marcar as células proliferativas, todos os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU) a  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em 0,9% NaCl, com  $0,07 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaOH, com uma dose de 60 mg de BrdU por kg de peso corporal, duas horas após a última injeção de etanol ou solução salina.

No oitavo dia de vida pós-natal ( $P_8$ ), todas as 18 ninhadas foram anestesiadas com pentobarbital sódico ( $50 \text{ mg/kg}$ , i.p.) e perfundidas primeiro com solução salina e depois com etanol a 70%. Seus encéfalos foram removidos e processados (MILLER, 1993). Os cérebros foram embebidos em parafina, seccionados no plano sagital em cortes com  $7 \mu\text{m}$  de espessura e montados em lâminas cobertas de gelatina. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em uma série de soluções de etanol, tratados primeiro com NaOH 1 N e depois com tampão borato de sódio 1 N, durante 20 minutos cada tratamento, e então lavados com tampão fosfato de sódio. Após tratamento com soro, os cortes foram incubados por 2 horas com uma solução 1:500 de anticorpos monoclonais anti-BrdU (Sigma, St. Louis, MO, B-5002), por 1 hora com uma

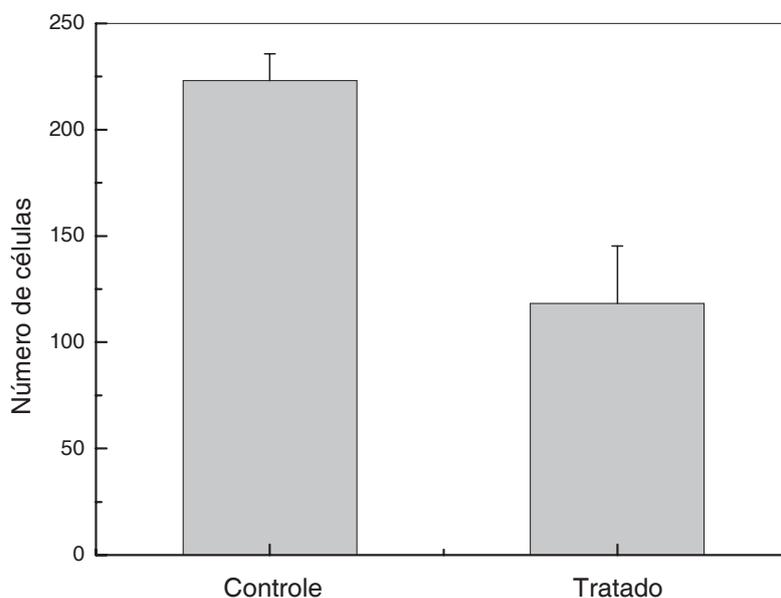
solução 1:200 de anticorpos secundários anti-ratos (Vector, Burlingame, CA, BA-9400), e então tratados com um complexo avidina-biotina (Vector) e com 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, D-5637). Os cortes foram cobertos com Entellan.

As quantidades de células dos dois grupos (controle e tratado) foram comparadas por análise de variância (ANOVA), com um valor de  $p < 0,01$  indicando significância na diferença entre os grupos. A análise estatística foi feita com utilização do programa Origin 6.0 (Microcal Software Inc.).

Os protocolos experimentais foram previamente aprovados por uma comissão institucional de ética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

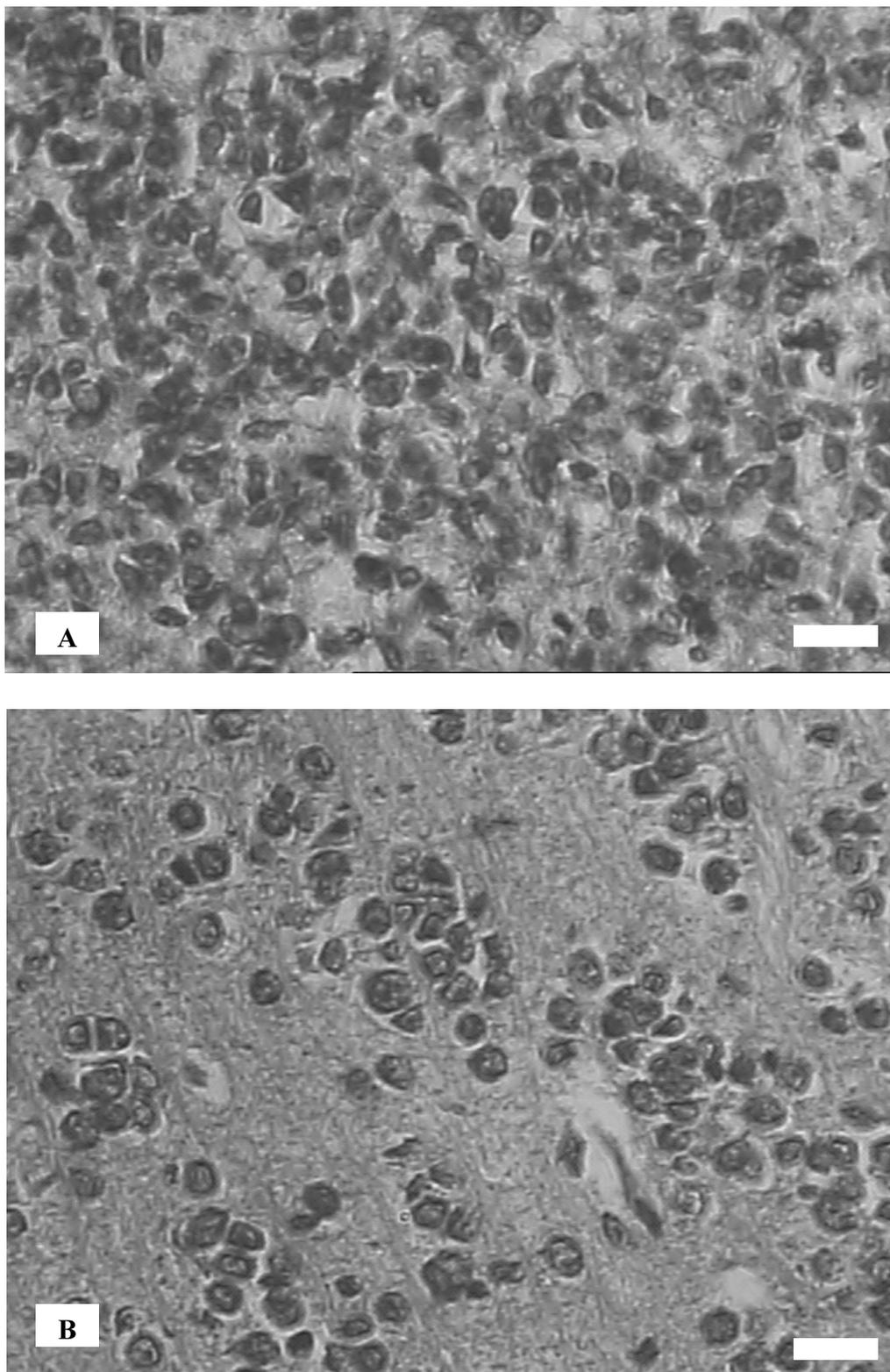
Os animais do grupo controle apresentaram um padrão típico de densidade neuronal no bulbo olfatório, sem heterotopia nem ectopia, mas os animais do grupo tratado apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de neurônios em relação aos animais do grupo controle (Figura 1).



**Figura 1.** Número de células por campo. As diferenças entre o grupo controle (N=6) e o grupo experimental (N=12) foram estatisticamente significantes ( $p < 0,01$ ).

A Figura 2 ilustra não somente essa diminuição na densidade, mas também diferenças na estruturação

dos neurônios do bulbo olfatório dos ratos do grupo tratado em relação ao grupo controle.



**Figura 2.** Diferenças morfológicas entre o bulbo olfatório de ratos do grupo controle (A) e do grupo tratado (B). Barra = 40  $\mu$ m.

Alterações celulares, moleculares e histológicas no bulbo podem afetar a sensibilidade olfatória do animal, podendo comprometer sua própria sobrevivência (FUJISAKI *et al.*, 2004; MORI; NAGAO; YOSHIHARA, 1999).

Alterações na geração, migração e concentração de neurônios no córtex pré-frontal têm sido freqüentemente descritas para a exposição crônica (BARRON; RILEY, 1992; CHEN; PARNELL; WEST, 1999; MORROW; KIEFER; METZLER, 1993; SHETTY; BURROWS; PHILLIPS, 1993), mas raramente para a exposição aguda ao etanol durante a vida intrauterina (FERREIRA *et al.*, 2004).

O trabalho de Ferreira *et al.* (2004) evidenciou a ocorrência de despopulação neuronal, ectopia e heterotopia no córtex pré-frontal de ratos expostos a tratamento agudo com etanol no décimo-segundo dia de vida intrauterina. Embora tenhamos também evidenciado despopulação neuronal (Fig. 1, Fig. 2), nós não detectamos a ocorrência de ectopia e de heterotopia no bulbo olfatório. Essa diferença pode ser justificada pelo fato da ação do etanol no bulbo olfatório ter ocorrido sobre células já geradas entre  $E_9$  e  $E_{11}$  (LÓPEZ-MASCARAQUE; CASTRO, 2004) e não sobre células em geração, como está ocorrendo no córtex pré-frontal em  $E_{12}$ , que é a data de nascimento dos neurônios do córtex (TAKAHASHI, NOVAKOWSKI; CAVINESS JUNIOR, 1996), mas não dos neurônios do bulbo olfatório (LÓPEZ-MASCARAQUE; CASTRO, 2004).

Os neurônios do córtex iriam formar o início da rede neuronal, com a geração de pistas moleculares e ambiente próprio para que as futuras populações neuronais

pudessem se desenvolver, mas muitos desses primeiros neurônios sofreram apoptose prematura em decorrência da ação danosa do etanol (FERREIRA *et al.*, 2004).

Em  $E_{12}$  já existia uma população incipiente de neurônios no bulbo olfatório, permitindo que os neurônios que chegassem pela rota de migração tangencial encontrassem ambientes propícios para se desenvolver (LÓPEZ-MASCARAQUE; CASTRO, 2004). A ação do etanol exatamente em  $E_{12}$ , quando os dendritos das células mitraes da primeira população neuronal estavam se formando, deve ter afetado a capacidade de fixação e desenvolvimento das populações ulteriores de neurônios, determinando uma diminuição na densidade neuronal em  $P_8$ , quando os animais foram sacrificados. Como o bulbo olfatório é uma das regiões cerebrais que têm uma neurogênese contínua (BEDARD; PARENT, 2004), seria interessante investigar os efeitos do etanol em  $E_{12}$  sobre a população neuronal do bulbo olfatório no animal adulto, a fim de detectar se as alterações observadas em  $P_8$  são posteriormente mantidas.

## CONCLUSÃO

A exposição aguda ao etanol de fêmeas grávidas de ratos Wistar no décimo-segundo dia de gravidez produziu um decréscimo significativo da densidade neuronal no bulbo olfatório de suas ninhadas no oitavo dia de vida pós-natal. Como os efeitos do etanol em ratos são equivalentes aos efeitos em humanos (DUMAS; RABES, 1994), é importante alertar as mulheres grávidas dos riscos que a exposição aguda ao etanol pode produzir sobre a neurogênese do filho em gestação.

---

**ABSTRACT:** The effects of the chronic use of ethanol during pregnancy on the morphology and function of the neural system are known in literature, but the effects of the acute use of ethanol at critical moments of pregnancy still need to be clarified. The chronic prenatal exposure to ethanol have been associated to several anomalies in fetus and new-born rats, as alterations in the neuronal density and heterotopy of neurons from the sub-ventricular zone of the telencephalon, in the olfactory bulb. In this paper, we have studied the effects of the acute prenatal exposure to ethanol (3 doses with 3 g/kg body weight) at the 12<sup>th</sup> day of intrauterine life ( $E_{12}$ ) on the morphology of the olfactory bulb at the 8<sup>th</sup> day of postnatal life ( $P_8$ ) in Wistar rats, when cells in the synthesis (S) phase were labeled *in vivo* with bromodeoxyuridine and the rats were sacrificed. The olfactory bulbs presented a significant decrease in the neuronal density, as also is observed in the fetal alcohol syndrome produced by the chronic exposure to ethanol during pregnancy. These effects might justify problems in the olfactory sensibility of the newborn babies which mothers suffered acute exposure to ethanol during their pregnancies.

**UNITERMS:** Olfactory bulb; Ethanol; Neuron; Fetal alcoholic syndrome; Acute toxicity.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BARRON, S.; RILEY, E. P. The effects of prenatal alcohol exposure on behavioral and neuroanatomical components of olfaction. **Neurotoxicol. Teratol.**, New York, v. 14, n. 4, p. 291-297, July/Aug. 1992.
- BEDARD, A.; PARENT, A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Brain. Res. Dev. Brain. Res.**, Baltimore, v. 151, n. 1-2, p. 159-168, July 2004.
- BURT, A. M. **Textbook of neuroanatomy**. Philadelphia: Saunders, 1993. 541 p.
- CHEN, W. J.; PARNELL, S. E.; WEST, J. R. Effects of alcohol and nicotine on developing olfactory bulb: loss of mitral cells and alterations in neurotransmitter levels. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 23, n. 1, p. 18-25, Jan. 1999.
- DOETSCH, F.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, n. 25, p. 14895-14900, Dec. 1996.
- DUMAS, R. M.; RABE, A. Augmented memory loss in aging mice after one embryonic exposure to alcohol. **Neurotoxicol. Teratol.**, New York, v. 16, n. 6, p. 605-612, Nov./Dec. 1994.
- FERREIRA, T. A. A.; MORAIS, J. O. R.; FERREIRA, N. R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. **Braz. J. Morphol. Sci.**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 97-101, May 2004.
- FUJISAKI, S.; SUGIYAMA, A.; EGUCHI, T.; WATANABE, Y.; HIRAIWA, H.; HONMA, D.; SAITO, T.; YASUE, H. Analysis of a full-length cDNA library constructed swine olfactory bulb for elucidation of expressed genes and their transcription initiation sites. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 66, n. 1, p. 15-23, Jan. 2004.
- GELOT, A.; ESPERANDIEU, O.; POMPIDOU, A. Histogenesis of the corpus callosum. **Neurochirurgie**, Paris, v. 44, n. 1, p. 61-73, May 1998.
- GHEUSI, G.; CREMER, H.; MCLEAN, H.; CHAZAL, G.; VINCENT, J.; LLEDO, P. M. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 97, n. 4, p. 1823-1828, Feb. 2000.
- KORNBLUM, H. I.; HUSSAIN, R. J.; BRONSTEIN, J. M.; LEE, D. C.; SEROOGY, K. B. Prenatal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 380, n. 2, p. 243-61, Apr. 1997.
- LEE, A. W.; EMSLEY, J. G.; BROWN, R. E.; HAGG, T. Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in tree inbred strains of mice. **Neuroscience**, Oxford, v. 118, n. 1, p. 263-270, Apr. 2003.
- LÓPEZ-MASCARAQUE, L.; CASTRO, F. Protocórtex frente a protomapa: una perspectiva desde el bulb. **Rev. Neurol.**, Barcelona, v. 39, n. 2, p. 146-155, July 2004.
- MAEDA, N.; NODA, M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTP beta and its ligand pleotrophin/heparin-binding growth associated molecule (HB-Gan) in neuronal migration. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 142, n. 1, p. 203-216, July 1998.

MARGRIE, T. W.; SAKMANN, B.; URBAN, N. N. Action potential propagation in mitral cell lateral dendrites is decremental and controls recurrent and lateral inhibition in the mammalian olfactory bulb. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 98, n. 1, p. 319-324, Jan. 2001.

MILLER, M. W. Migration of cortical neurons is altered by gestation exposure to ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 17, n. 2, p. 304-314, Apr. 1993.

MORI, K.; NAGAO, H; YOSHIHARA, Y. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. **Science**, Washington, v. 286, n. 5440, p. 711-715, Oct. 1999.

MORROW, N. S.; KIEFER, S. W.; METZLER, C. W. Gustatory and olfactory contributions to alcohol consumption in rats. **Alcohol**, New York, v. 10, n. 4, p. 263-267, July/Aug. 1993.

PIERRE-MARIE, L.; SAGHATELYAN, A.; LEMASSON, M. Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function. **Neuroscientist**, Baltimore, v. 10, n. 4, p. 292-303, Aug. 2004.

SAGHATELYAN, A.; CARLETON, A.; LAGIER, S.; CHEVIGNY, A; LLEDO, P. M. Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb. **J. Physiol. Paris**, Paris, v. 97, n. 4-6, p. 517-528, July/Nov. 2003.

SHETTY, A. K.; BURROWS, R. C.; PHILLIPS, D. E. Alterations in neuronal development in the substantia nigra pars compacta following in utero ethanol exposure immunohistochemical and Golgi studies. **Neuroscience**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 311-322, Jan. 1993.

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

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS JUNIOR, V. S. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. **J. Neurosci.**, Washington, v. 16, n. 19, p. 6183-6196, Oct. 1996.

VICARIO-ABEJÓN, C.; YUSTA-BOYO, M. J.; FERNÁNDEZ-MORENO, C.; DE PABLO, F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. **J. Neurosci.**, Washington, v. 23, n. 3, p. 1-12, Feb. 2003.