



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA**

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CÂMPUS DE ARAÇATUBA-FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Karina Yuri Kondo

Utilização do estereotáxico para implante de cânulas no
Sistema Nervoso Central

Araçatuba

2010

Karina Yuri Kondo

Utilização do estereotáxico para implante de cânulas no Sistema Nervoso Central

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista-UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Araçatuba

2010

Karina Yuri Kondo

Utilização do estereotáxico para implante de cânulas no
Sistema Nervoso Central

Orientador Professor Dr. João Carlos Callera - Unesp Araçatuba.

Professor Dr. João César Bedran de Castro- Unesp Araçatuba.

Professora Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende- Unesp
Araçatuba.

Araçatuba

2010

Dedico este trabalho aos meus pais, avós e irmão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais.....

Ao meu professor orientador.....

E à Instituição.

Araçatuba

2010

“Tudo o que somos nasce com nossos pensamentos. Em nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo”. (Buda).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a descrição da técnica de implante de cânulas-guia no sistema nervoso central, mais especificamente no Núcleo Parabraquial Lateral (NPBL) de ratos Wistar, utilizando-se o aparelho estereotáxico. Por meio desta técnica, pode-se fazer lesões elétricas ou químicas e também a injeção de drogas nessa área e avaliar os efeitos que estas têm sobre o local de interesse. Para fazer as injeções das drogas no NPBL, os animais foram adequadamente anestesiados, e implantados cânulas-guias no NPBL usando as coordenadas histológicas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Neste trabalho, faremos a descrição da técnica de implante de cânulas e a apresentação de alguns resultados obtidos no laboratório, mostrando efeitos cardiovasculares e na ingestão de água e sódio hipertônico (NaCl 1.8%) promovido por injeções no NPBL bilateral de muscimol, agonista do receptor GABA_A.

PALAVRAS-CHAVE: Muscimol, Receptores GABA_A, Núcleo Parabraquial Lateral, Estereotáxico, Cânulas-Guias, Ratos.

ABSTRACT

This study aimed to describe the technique of implantation of guide cannulae in the lateral parabrachial nucleus (NPBL) in rats, using the stereotaxic apparatus. Through this technique, one can make any electrical or chemical injury and also injecting drugs in this area and assess the effects these have on the site of interest. To make the injections of drugs in NPBL, the animals were adequately anesthetized, and implanted cannula-guides using the coordinates of Histological Atlas of Paxinos and Watson (1986). In this work, we described the technique of implantation of cannulae and present some results obtained in the laboratory, showing cardiovascular, water intake and hypertonic sodium chloride (1.8% NaCl) effects promoted by injections of muscimol, a GABA_A receptor agonist in bilateral NPBL.

KEYWORDS: Muscimol, GABA_A Receptors, Lateral Parabrachial Nucleus, Stereotaxic, Guide-Cannulas, Rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Victor Alexander Haden Horsley (A) e Robert Henry Clark (B).
- Figura 2: Gaiolas individuais no biotério.
- Figura 3: Anestésico (Ketamina) e relaxante muscular (Xilazina).
- Figura 4: Início da tricotomia em cabeça de rato.
- Figura 5: Tricotomia.
- Figura 6: Estereotáxico (modelo David-Kopf) para cirurgia em pequenos animais
- Figura 7: Colocação do rato no aparelho estereotáxico com o auxílio das barras auriculares.
- Figura 8: Incisão longitudinal com bisturi.
- Figura 9: Exposição das suturas lambda e bregma.
- Figura 10: Cânulas de aço inoxidável acopladas ao aparelho estereotáxico.
- Figura 11: Perfuração do osso para colocação dos parafusos de aço inox.
- Figura 12: Colocação e fixação dos parafusos.
- Figura 13: Perfuração da calota craniana com broca.
- Figura 14: Utilização da broca para perfuração da calota craniana.
- Figura 15: Utilização da resina acrílica para dar suporte à cânula-guia.
- Figura 16: Resina acrílica na cabeça do rato.
- Figura 17: Gaiolas individuais para recuperação pós-operatório.
- Figura 18: Seringa Hamilton de 10 μ l.
- Figura 19: Injeção da droga no NPBL utilizando a seringa de Hamilton.
- Figura 20: Introdução da injetora na cânula-guia previamente implantada no NPBL.
- Figura 21: Abertura da região torácica para exposição do coração para perfusão com salina tamponada.
- Figura 22: Procedimento para remoção do encéfalo.

Figura 23: Remoção com alicate.

Figura 24: Encéfalo.

Figura 25: Criostato (Leica).

Figura 26: Colocação das fatias do encéfalo nas lâminas.

Figura 27: Lâminas montadas para análise microscópica.

Figura 28: Fotomicrografia de um rato representativo, mostrando a área de injeção do corante Azul de Evans 2% no NPBL bilateral.

Figura 29: Efeitos da injeção no NPBL bilateral do muscimol na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos hidratados.

Figura 30: Efeitos da injeção prévia do antagonista GABA_A no NPBL bilateral sobre a ingestão de água e NaCl 1.8% induzido pelo muscimol em ratos hidratados

Figura 31: Efeitos da injeção de muscimol no NPBL bilateral sobre a ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados de sódio (modelo FURO + CAP).

Figura 32: Efeitos da injeção de muscimol ou baclofen no núcleo do trato solitário (NTS) sobre o reflexo Bezold-Jarisch.

Figura 33: Representação esquemática, mostrando a área de injeção do corante Azul de Evans 2% no NTS bilateral.

SUMÁRIO

1. Resumo	6.
2. Abstract	7.
3. Lista de figuras	8 e 9.
4. Introdução	11 e 12.
5. Materiais e métodos	13 a 41.
6. Resultados	42 a 47.
7. Discussão	48 e 49.
8. Conclusão	50.
9. Referências Bibliográficas	51.

INTRODUÇÃO

O método estereotáxico teve seu nascimento com o estudo da neuroanatomia. Com o desenvolvimento de métodos para fixar e corar tecidos do sistema nervoso central, os neuroanatomistas começaram a traçar as complicadas conexões dentro e entre as áreas cerebrais. O procedimento incluía, destruição de uma área determinada no cérebro do animal de experimentação e, daí sacrificá-los mais tarde. Após uma adequada fixação, o anatomista estudava através de secções finas do tecido nervoso, traçando as vias de fibras de degeneração, que saiam da área lesada. Para que estes resultados fossem reproduzíveis, era preciso construir um aparelho que permitisse realizar lesões precisas em estruturas do sistema nervoso central.

Horsley e Clarke (1908), estudando as conexões do cerebelo em macaca mulata, sentiram a necessidade de desenhar um método para fazer lesões discretas, nos vários núcleos cerebelares (figura 1). O cérebro foi dividido em três planos: horizontal, sagital, frontal e, daí um sistema de três coordenadas foi derivado.

O valor da cirurgia estereotáxica para a neurofisiologia é fundamental para seu trabalho. O uso das técnicas estereotáxicas permite colocar eletrodos com precisão para estimulação (elétrica ou química) circunscritas do encéfalo ou para destruir células em áreas selecionadas e estudar os efeitos no comportamento do animal de experimentação. Pela estereotaxia podemos também implantar um termistor, que mede a temperatura da área cerebral em que foi implantado. Podemos ainda avaliar a temperatura através de fluxo de um líquido, por exemplo, água com a temperatura controlada. Os métodos de estereotaxia também permitem a implantação de cânulas em áreas centrais, como por exemplo, o núcleo

parabraquial lateral (NPBL) por um período prolongado de tempo, permitindo a injeção de diferentes substâncias, tais como drogas ou hormônios, diretamente no encéfalo de animais anestesiados (preparação aguda) e não anestesiados (preparação crônica) e o estudo das alterações promovidas por estas drogas ou hormônios em variáveis cardiovasculares (Pressão Arterial Sistêmica e Frequência Cardíaca) e parâmetros hidroeletrólíticos (Ingestão de água e cloreto de sódio hipertônico).

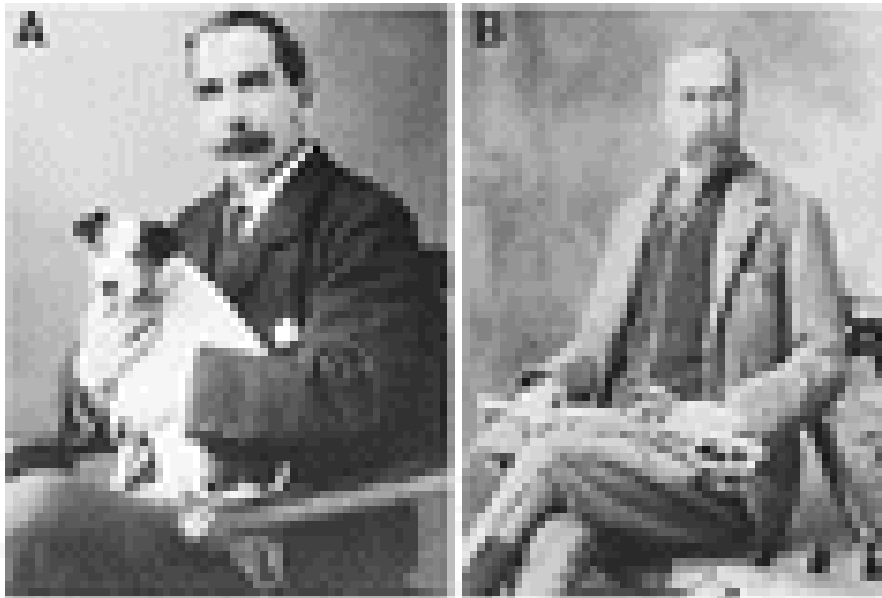


Figura 1: Victor Alexander Haden Horsley (A) e Robert Henry Clark (B).

MATERIAIS E MÉTODOS:

1- Animais:

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar com peso padronizado entre 280 e 300 gramas, no início dos experimentos. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério central do câmpus da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no laboratório sob condições adequadas de umidade ($55\pm 10\%$) e temperatura (22°C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas começando às 7 horas da manhã (Figura 2). Água, NaCl 1.8% e ração granulada (Guabi) estavam livremente disponível nas gaiolas.



Figura 2: Gaiolas individuais no biotério.

2 – Cirurgia para implante de cânulas no NPBL:

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (120 mg/kg i.p) e xilazina (7 mg/kg i.p.) (figura 3). Em seguida, realizou-se a tricotomia na cabeça do rato para facilitar a cirurgia e evitar possíveis infecções (figuras 4 e 5). Os ratos foram adaptados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, figura 6) e com o auxílio de duas barras auriculares, a cabeça do animal foi colocada em posição fixa (figura 7). Após a assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal

(figura 8) com uma lâmina de bisturi para exposição da calota craniana, expondo as linhas lambda e bregma (figura 9) que foram utilizadas como referência para nivelar a cabeça do rato no mesmo nível horizontal, utilizadas como parâmetro para que o NPBL fosse localizado.

Utilizando-se a linha bregma e a linha mediana, foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável, segundo as coordenadas obtidas do Atlas Histológico de Paxinos e Watson (1986): 9,5 mm caudal ao bregma; 2,2 mm lateral a linha média e 3,9 mm abaixo da duramater. Essas cânulas de aço inoxidável (12 mm), confeccionadas à partir de agulhas hipodérmicas (25x0,6 mm), foram posicionadas bilateralmente 2 mm acima do NPBL, para que essa estrutura não fosse lesionada no momento da injeção (figura 10). As cânulas foram fixadas ao crânio do rato com resina acrílica de uso odontológico e ancorada por pequenos parafusos de aço inox, previamente introduzidas no osso (figuras 11, 12). Nestes pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro (figura 13 e 14).

Após a completa secagem e fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e, para impedir a obstrução da cânula guia até a realização dos experimentos, foi introduzida na mesma um mandril (12 mm) também de aço inoxidável(figuras 15 e 16). O rato foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia, para evitar o surgimento de infecção no período de restabelecimento do animal , foi injetado 0.2 ml de um antibiótico veterinário (associação de penicilina com estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular. Terminada a cirurgia cerebral, os ratos foram devolvidos em suas gaiolas

individuais (figura 17) com ração, água de torneira e NaCl 1.8%, por um período de, pelo menos 5 dias, antes do início dos experimentos.



Figura 3: Anestésico (Ketamina) e relaxante muscular (Xilazina).



Figura 4: Início da tricotomia em cabeça de rato.



Figura 5: Tricotomia.



Figura 6: Estereotáxico (modelo David-Kopf) para cirurgia em pequenos animais.



Figura 7: Colocação do rato no aparelho estereotáxico com o auxílio das barras auriculares.



Figura 8: Incisão longitudinal com bisturi.



Figura 9: Exposição das suturas lambda e bregma.



Figura 10: Cânulas de aço inoxidável acopladas ao aparelho estereotáxico.



Figura 11: Perfuração do osso para colocação dos parafusos de aço inox.

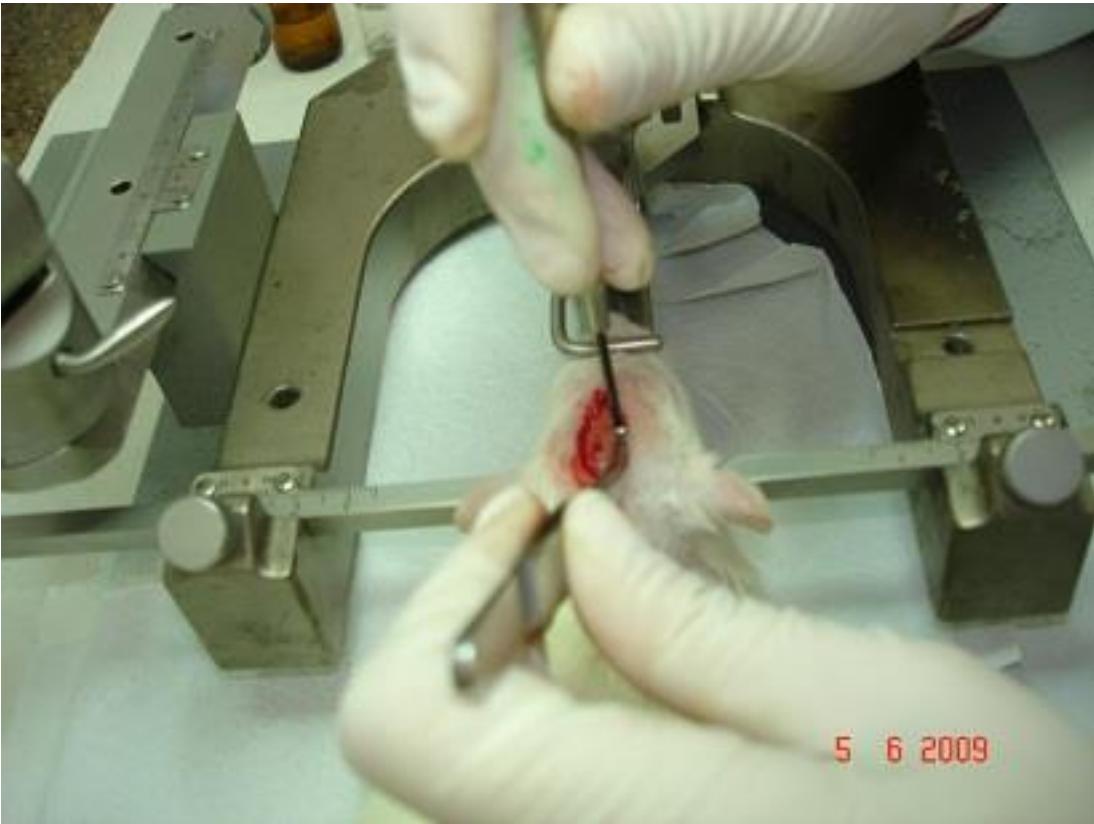


Figura 12: Colocação e fixação dos parafusos.



Figura 13: Perfuração da calota craniana com broca.



Figura 14: Utilização da broca para perfuração da calota craniana.



Figura 15: Utilização da resina acrílica para dar suporte à cânula-guia.

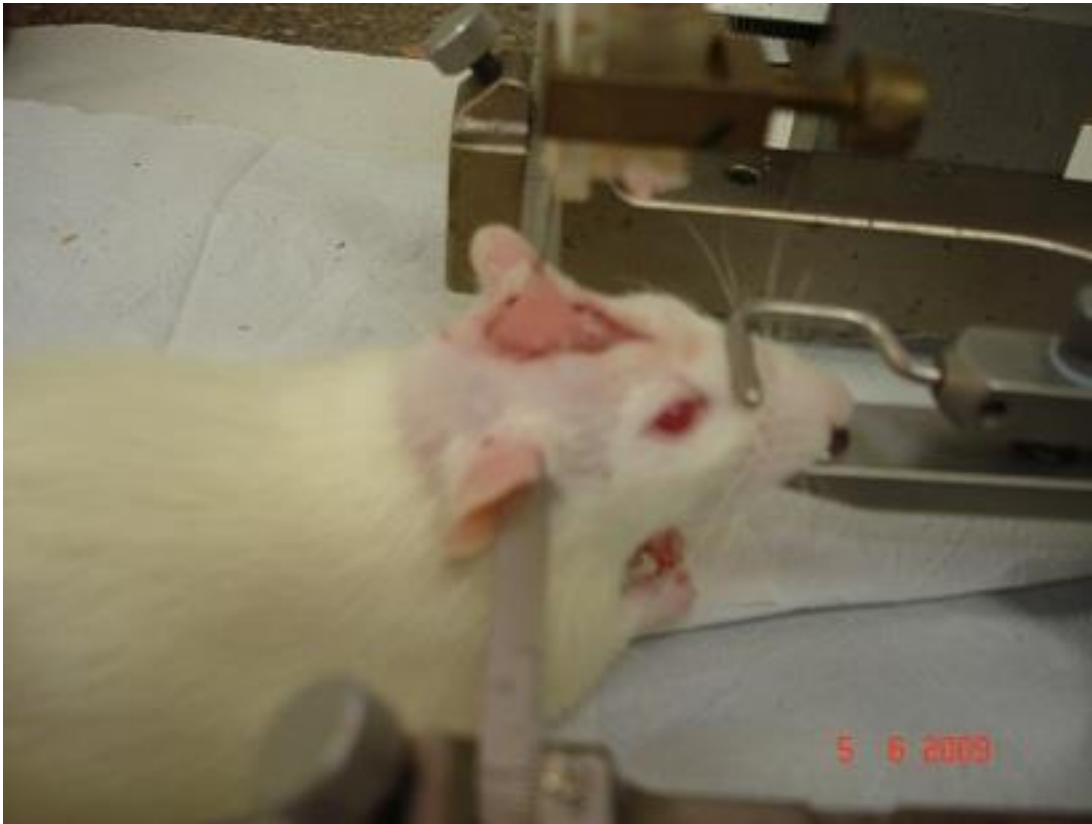


Figura 16: Resina acrílica na cabeça do rato.



Figura 17: Gaiolas individuais para recuperação pós-operatório.

3 – Injeção de drogas no NPBL:

As drogas foram dissolvidas em salina fisiológica e injetadas no núcleo parabraquial lateral (NPBL) de ratos, de acordo com o protocolo experimental utilizado, usando-se uma seringa Hamilton de 10 μ l (figura 18), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (30 gauge de diâmetro) que foi introduzida no NPBL através da cânula guia previamente fixada (figura 19 e 20). A cânula injetora foi 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume da injeção foi de 0,2 μ l (200 nl).



Figura 18: Seringa Hamilton de 10 µl.



Figura 19: Injeção da droga no NPBL utilizando a seringa de Hamilton.



Figura 20: Introdução da injetora na cânula-guia previamente implantada no NPBL.

4 – Soluções e drogas:

- Muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) e bicuculina (1.6 nmol/0.2 μ l);
- Solução fisiológica (NaCl 0.9%) e solução hipertônica de NaCl 1.8% ;
- (\pm)-Baclofen (agonista GABA_B);
- Serotonina (5-HT; 5 nmol/50 nl).

5 – Histologia Cerebral:

Terminados os experimentos, os ratos receberam uma injeção no NPBL bilateral do corante Azul de Evans 2% (volume de 0.2 μ l) para determinar o local específico das injeções. A seguir, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (100 mg/kg) e submetidos a abertura da região torácica para exposição do coração para perfusão com salina tamponada seguida de solução de formol 10% (figura 21). Para facilitar a perfusão cerebral, a artéria aorta descendente foi bloqueada com pinça hemostática e a cava superior seccionada. A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formol 10% por alguns dias (figuras 22, 23 e 24). Cortes transversais (60 μ m de espessura) foram feitos nos pontos de injeção das drogas com auxílio de um aparelho Criostato (figuras 25). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram analisados a fresco para se localizar os pontos das injeções (figuras 26 e 27). Somente os ratos que apresentaram marcações no NPBL bilateral foram considerados na análise estatística dos resultados.



Figura 21: Abertura da região torácica para exposição do coração para perfusão com salina tamponada.



Figura 22: Procedimento para remoção do encéfalo.

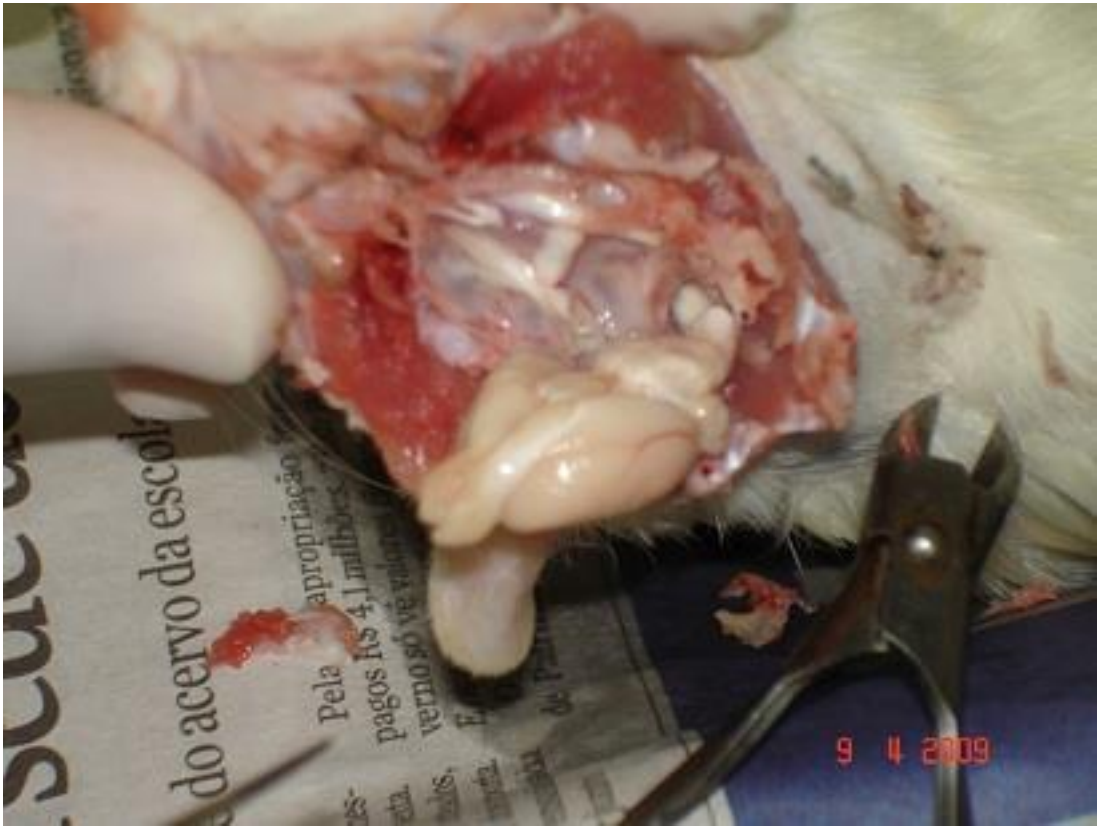


Figura 23: Remoção com alicate.



Figura 24: Encéfalo.



Figura 25: Criostato (Leica).



Figura 26: Colocação das fatias do encéfalo nas lâminas.



Figura 27: Lâminas montadas para análise microscópica.

RESULTADOS OBTIDOS COM A UTILIZAÇÃO DO ESTEREOTÁXICO:

Análise Histológica:

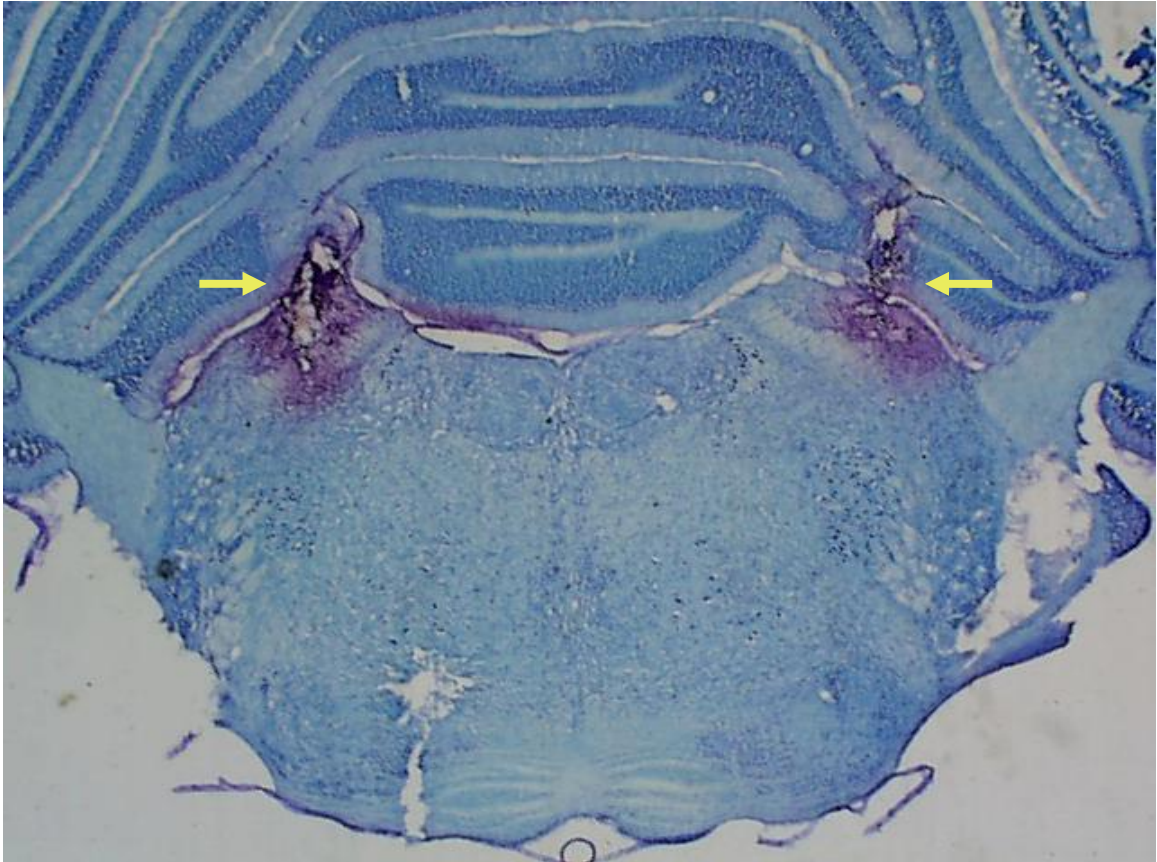


Figura 28: Fotomicrografia de um rato representativo, mostrando a área de injeção do corante Azul de Evans 2% no NPBL bilateral (setas).

1 - Efeitos da injeção no NPBL bilateral do muscimol na ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos hidratados

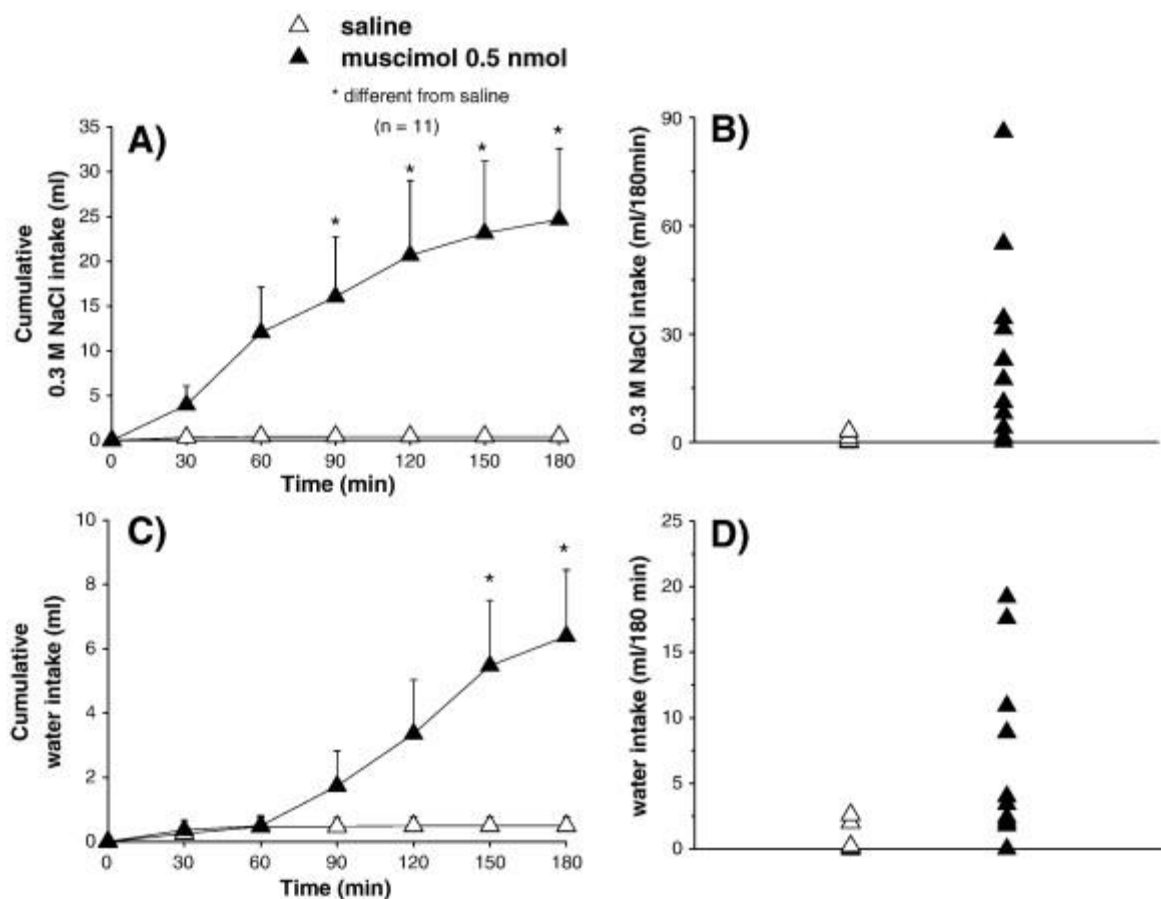


Fig. 29. (A) Ingestão cumulativa de 0.3 NaCl; (B) Ingestão individual de 0.3 NaCl; (C) Ingestão cumulativa de água; (D) Ingestão individual de água por ratos normovolêmicos e hidratados que receberam injeções bilaterais de muscimol (0.5nmol/0.2 μ l) ou salina no NPBL. A e C são valores médios \pm E.P.M; *n*, número de ratos.

2 - Efeitos da injeção prévia do antagonista GABA_A no NPBL bilateral sobre a ingestão de água e NaCl 1.8% induzido pelo muscimol em ratos hidratados

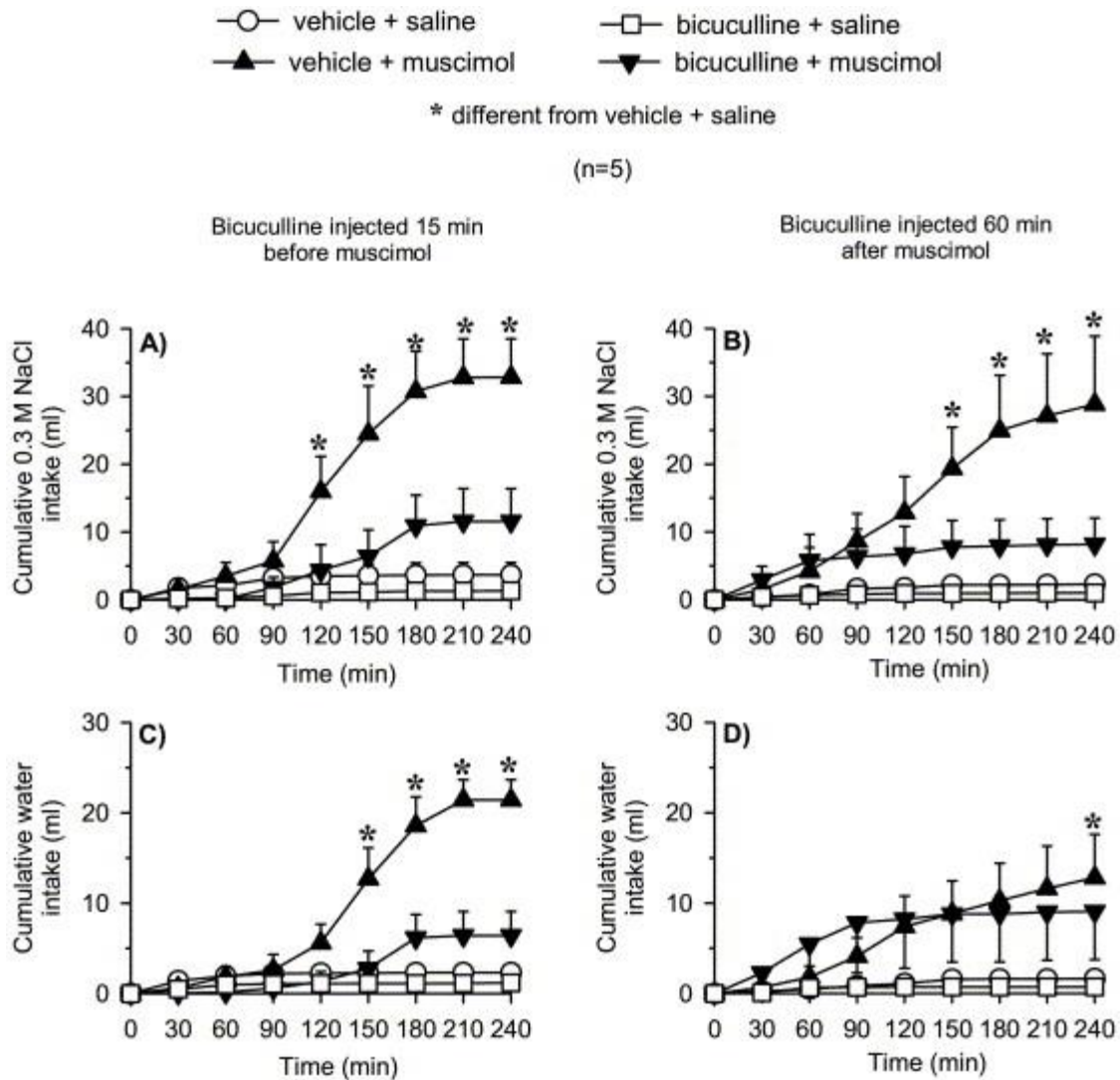


Fig.30 - (A,B) Ingestão cumulativa de 0.3M NaCl; (C,D) Ingestão cumulativa de água em ratos hidratados e saciados que receberam injeções de bicuculina (1.6nmol/0.2µl) ou veículo combinado com muscimol (0.5nmol/0.2µl) ou salina bilateralmente no NPBL. Os gráficos a esquerda são representados quando a bicuculina foi injetada 15 minutos antes do muscimol e nos gráficos a direita representam a ingestão quando a bicuculina foi injetada 60 min após muscimol. Os resultados são expressos como média ±E.P.M., *n* = número de ratos.

3 - Efeitos da injeção de muscimol no NPBL bilateral sobre a ingestão de água e NaCl 1.8% em ratos depletados de sódio (modelo FURO + CAP)

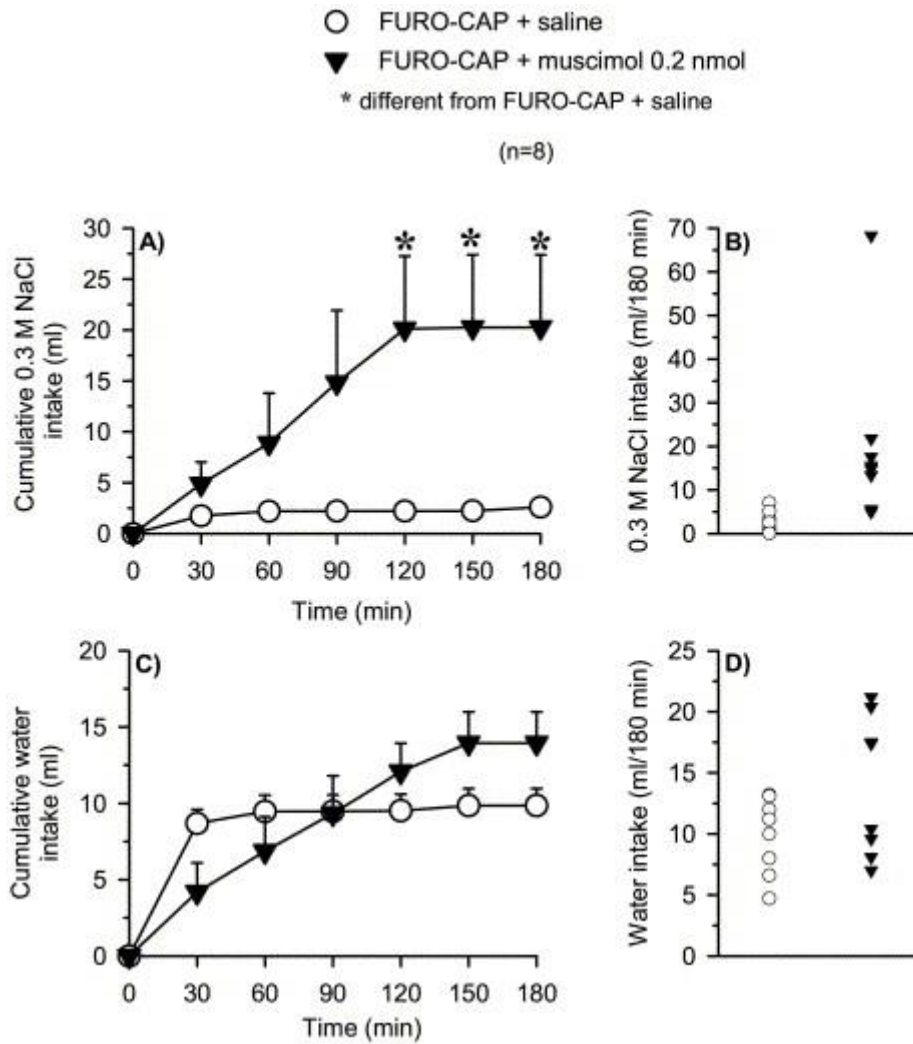


Fig. 31 -A) Ingestão cumulativa de 0.3 M NaCl; (B) Ingestão individual de 0.3 M NaCl; (C) Ingestão cumulativa de água; (D) Ingestão individual de água induzida pela administração subcutânea (s.c.) de FURO+CAP em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0.2 nmol/0.2µl) ou salina no NPBL. Resultados são expressos como média ± E.P.M.; n, número de ratos.

4 - Efeitos da injeção de muscimol ou baclofen no núcleo do trato solitário (NTS) sobre o reflexo Bezold-Jarisch

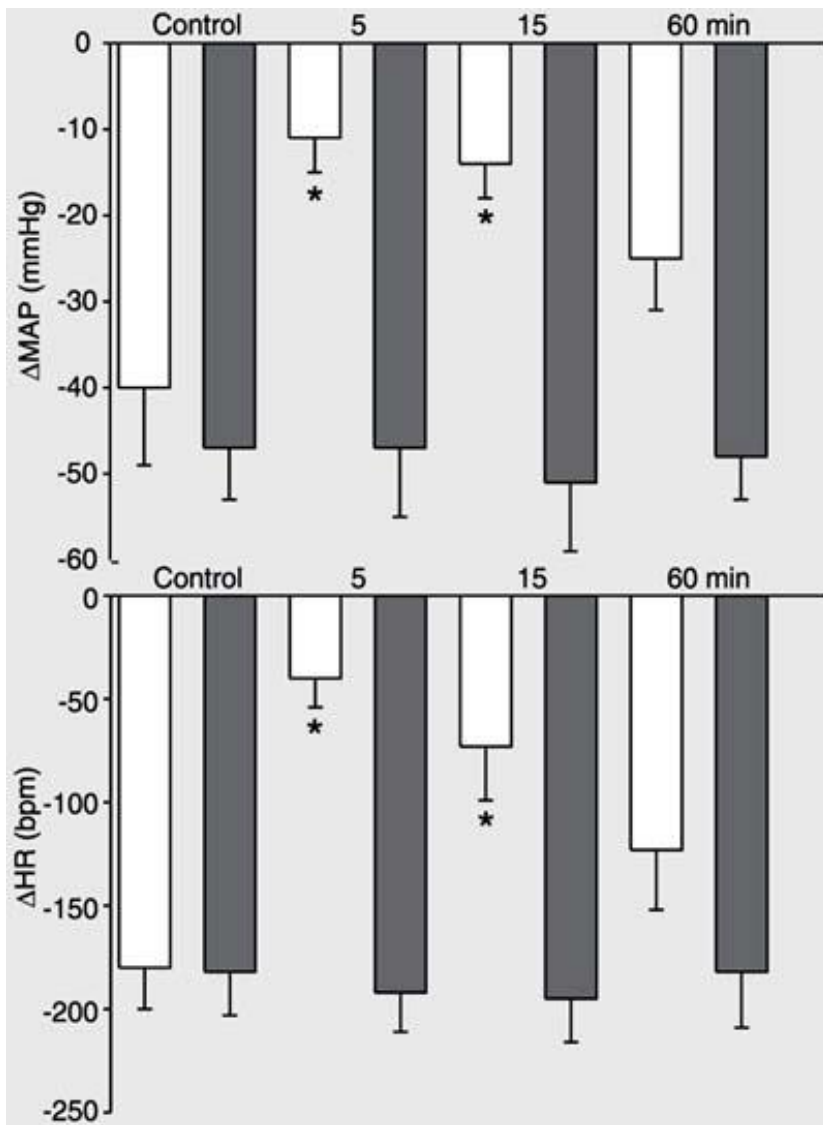


Fig. 32. Alterações de Pressão Arterial Média (Δ MAP, mmHg) e Frequência Cardíaca (Δ HR, bpm) em resposta a injeção de serotonina (5-HT, 2 μ g/rato, i.v.) antes (resposta controle) e 5, 15 e 60 min antes das injeções bilaterais de muscimol (50 pmol/50nl n= 8; barras abertas) ou baclofen no NTS (12.5 pmol/50nl n=7; barras cheias). * $P < 0.05$ comparado ao respectivo controle.

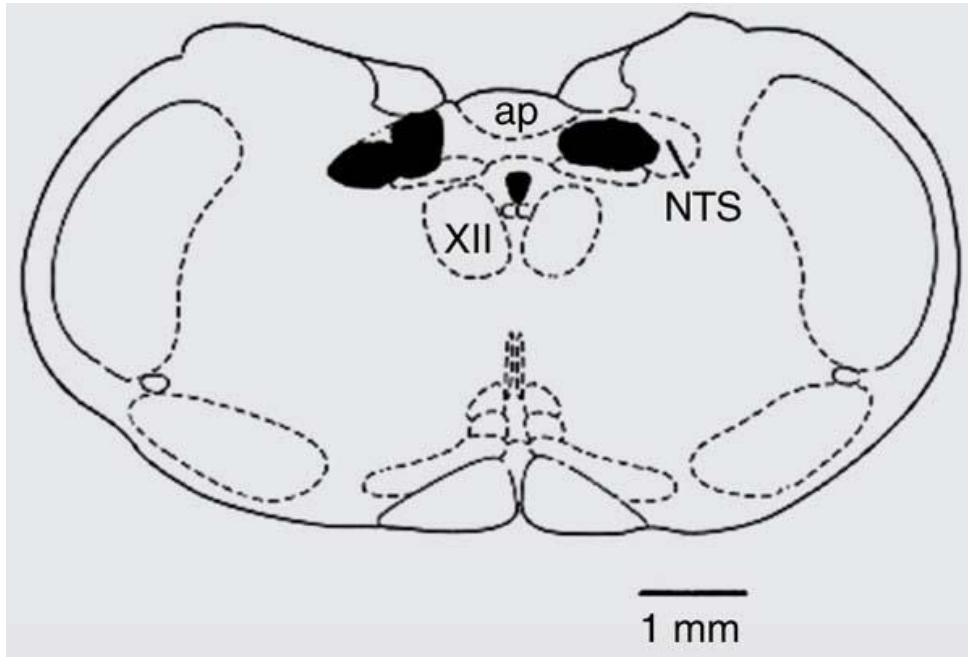


Figura 33: Representação esquemática, mostrando a área de injeção do corante Azul de Evans 2% no NTS bilateral.

DISCUSSÃO:

O objetivo do presente trabalho foi apresentar a técnica de implante de cânulas no núcleo parabraquial lateral (NPBL) utilizando o estereotáxico para a realização de estudos em animais não anestesiados. A implantação de cânulas no NPBL permitiu a realização de estudos para avaliar o efeito dos mecanismos GABAérgicos no controle cardiovascular e na ingestão de água e sódio hipertônico induzido pelo muscimol em ratos.

O NPBL é uma estrutura pontina localizada dorsalmente ao pendúnculo cerebelar superior e é uma importante área envolvida no controle de ingestão de água e de sódio (Ohman e Johnson 1986, Ohman e Johnson 1995, Menani e Johnson 1995, Colombari e cols., 1996 e Menani e cols., 1996).

O NPBL recebe projeções aferentes da área postrema medial e do núcleo do trato solitário e envia projeções eferentes para áreas do prosencéfalo envolvidos no balanço de líquidos e eletrólitos, como o núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo central da amígdala e núcleo pré-óptico mediano.

Os resultados que foram apresentados neste trabalho (Callera e cols., 2005 e Kimura e cols., 2007) mostraram que o implante de cânulas no NPBL de ratos utilizando o estereotáxico, possibilitou a injeção do agonista do receptor GABA_A, muscimol, e a observação da resposta de aumento de ingestão cumulativa de água e NaCl hipertônico (figuras 29 e 30).

Mostramos também, que o implante de cânulas em outra área do sistema nervoso central, mais especificamente no bulbo, o Núcleo do Trato Solitário (NTS), possibilitou a observação que a injeção do muscimol promove aumento de pressão arterial (hipertensão). Os efeitos observados após a injeção do muscimol no NPBL ou NTS, se deve a ação desta droga em receptores GABA_A, pois a hipertensão e a ingestão de água e NaCl 1.8%, foram bloqueados após a injeção prévia ou 60 minutos após a injeção do antagonista seletivo de receptores GABA_A (bicuculina) no NPBL e NTS (figura 30).

Na figura 31, utilizando ratos depletados de sódio, usando a associação do diurético furosemida e o inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), captopril (modelo

FURO+CAP), injetados periféricamente, a injeção de muscimol no NPBL também promoveu aumento da ingestão de água e sódio.

Em um outro trabalho, utilizando o estereotáxico, foi feito o implante de cânulas no NTS e observado o efeito da injeção do muscimol e do baclofen (agonista GABA_B) no reflexo cardiopulmonar (reflexo Bezold-Jarisch) induzido pela administração intravenosa de serotonina (5-HT) em ratos não anestesiados. Este trabalho mostrou que a injeção no NTS do agonista do receptor GABA_A, mas não do receptor GABA_B, reduziu significativamente a hipotensão e bradicardia induzida pela serotonina.

Portanto, utilizando a técnica de implante de cânulas no sistema nervoso central de ratos, com o auxílio do estereotáxico, permite a realização de diversos estudos em ratos não anestesiados. Estudos do laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba tem investigado os diferentes mecanismos GABAérgicos do NPBL e do NTS no controle cardiovascular e na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico (ingestão de água e NaCl hipertônico) utilizando o aparelho estereotáxico como ferramenta de estudo.

CONCLUSÃO:

Concluimos que a neurocirurgia estereotáxia começou com o desenvolvimento de um modelo ortogonal para uso em animais por Horsley e Clark e se tornou um campo ativo de pesquisas e tratamento para patologias humanas. Avanços na estereotaxia (originada do grego, “stereo” significa 3D e “taxis” significa arranjo ordenado) tem permitido alcançar lesões intra e extra-cranianas que não eram possíveis de serem tratadas no passado. Os recentes cirurgiões e cientistas da estereotaxia lançaram as bases para a futura inovação. Devido aos seus esforços, a neurocirurgia estereotáxia é agora um crescente e independente campo de estudo.

Assim, graças a Horsley e Clark que começaram a estereotaxia com animais foi-se possível um avanço na neurocirurgia, trazendo benefícios à população e também possibilitando a administração de drogas para o estudo de seus efeitos no SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Callera, J.C.; Colombari of GABA_A receptors in the nucleus tractus solitaries of awake rats., E.; De Luca Jr, L.A. and Menani J.V.(2005). The bradycardiac and hypotensive responses to serotonin are reduced by activation of GABA_A receptors in the nucleus tractus solitaries of awake rats.
- Callera, J.C.; Oliveira, L.B.; Barbosa, S.P.; Colombari, D.S.A.; Luca L.A. and Menani J.V.(2005). GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake.receptor
- Horsley, V.; Clarke RH (1908). The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain* 31:45–124.
- Kimura, E.V.; Oliveira, L.B.; Colombari, D.S.A.; De Luca, L.A.; Menani, J.V.; Callera, J.C. (2007). Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA_A receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus.
- Maryan Rhaman, M.D., Gregory J.A. Murad, M.D., and, J. Mocco, M.D., M.S. (2009).Early history of the stereotatic, apparatus in neurosurgery. Volume 7, Number 3.
- PAXINOS, G. and WATSON, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition, Academic Press, New York.

