

ALTERAÇÕES CELULARES NA GLÂNDULA PINEAL DE RATAS ALBINAS. EFEITO DA ESTIMULAÇÃO SONORA DIÁRIA

BELARMINO ALVES DE AZEVEDO*
PEDRO FONTANA JUNIOR*

Foi observado haver uma relação entre o estímulo sonoro intenso e alterações morfológicas na glândula (gl.) pineal de ratas adultas. Estes animais foram estimulados por uma campainha elétrica, com nível de intensidade sonora em torno de 110 dB, por 1, 2, 4 e 7 dias e como também por mais 10 estímulos sucessivos no sétimo dia. Foram observadas alterações celulares, tais como: núcleos picnóticos, vacuolizações e perda do aspecto lobular da distribuição dos pinealócitos, sendo que estas alterações se agravam com o aumento do número de estimulações.

Intensificou-se grandemente o interesse pela gl. pineal em vários campos de atividades de pesquisas, logo após a evidenciação do seu hormônio, a melatonina, por Lerner et al, 1958. Podemos citar como exemplos os trabalhos em bioquímica de Axelrod & Weissbach, 1960, Axelrod et al., 1965 e Wurtman & Axelrod, 1966; os estudos histológicos de Anderson, 1960; os estudos de microscopia eletrônica de Pellegrino De Iraldi & De Robertis, 1961, De Robertis & Pellegrino De Iraldi, 1961 e Upson et al., 1976, ou sobre os efeitos produzidos pela melatonina em outras estruturas e órgãos, conforme Minneman & Wurtman, 1975 e Reider, 1973.

Estas investigações, na sua grande maioria, mostram que a pineal tem sido relacionada com as variações dos níveis de luz do meio ambiente e é nosso propósito no presente trabalho verificar a existência ou não de alterações histológicas na gl. pineal de ratas submetidas ao estímulo sonoro, uma vez por dia, em dias consecutivos.

MATERIAL E MÉTODOS

1 – Animais

Em todas as experiências, utilizamo-nos de ratas albinas que pesavam entre 130 e 160g, obtidas do biotério geral do Instituto Oswaldo Cruz. Os animais eram guardados em caixa de alumínio galvanizado, medindo 36 x 24 x 16cm, sendo 5 animais por caixa.

*Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926, 20000 – Rio de Janeiro, Brasil.

Trabalho subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
Recebido para publicação em 12 de novembro de 1976.

Estipulou-se um regime, no qual a luz incandescente era ligada às 7 horas e desligada às 19 horas.

2 – Preparação histológica do material

As ratas foram mortas por concussão cervical, entre 12h30min e 13h30min. Para o estudo histológico, as glândulas após terem sido perfundidas *in situ*, com solução a 10% de formol neutro, foram deixadas por mais tempo (48 horas) imersas no líquido fixador à temperatura ambiente. Após a lavagem em água corrente, foi feita a desidratação em série alcoólica de concentração crescente, diafanização pelo xilol e inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram realizados com a espessura de $5\ \mu$ orientados em relação transversal ao maior comprimento da glândula, que é de forma piriforme, sendo selecionados os de maior diâmetro. Usamos exclusivamente como coloração a hematoxilina e eosina.

3 – Estimulação sonora

As ratas foram estimuladas individualmente, durante 3 minutos em cada sessão, por uma campainha elétrica com tímpano de 12", que foi colocada a 30cm do piso de uma caixa em madeira compensada revestida com eucatex acústico, medindo 40 x 40 x 40cm e embutida em outra caixa acústica semelhante de 60 x 60 x 60cm; a combinação de duas caixas acústicas bloqueava satisfatoriamente a saída do som para o ambiente externo.

Utilizamo-nos de um medidor de nível sonoro (Brüel & Kjaer tipo 2202), que registrou um nível sonoro em tomo de 110 dB, colhido diretamente do piso do interior da caixa de estimulação. Para o registro da vibração da caixa, que sempre ocorre quando se liga a campainha, fizemos uso de um integrador (ZR 0020) e de um acelerômetro (tipo 4339), ambos de marcas Brüel & Kjaer, encontrando-se os seguintes valores: amplitude de $0,4 \times 10^{-4}$ m, velocidade de $3,5 \times 10^{-3}$ m/s e aceleração de $8,5 \times 10^{-2}$ m/s².

3.1 – Grupo controle

Utilizamo-nos de 6 ratas que não receberam estímulo sonoro, mas que foram colocadas no interior da caixa, durante 3 minutos, para controle das condições de hipoxia e de outras influências ambientais.

3.2 – Grupos estimulados pelo som

Constituíram-se os seguintes grupos experimentais:

a) Ratas estimuladas somente 1 dia, com apenas 1 estímulo de 3 minutos de duração. Com esta única estimulação foi possível selecionar dois grupos, quanto ao aspecto de apresentarem ou não convulsão epileptiforme audiogênica: um grupo de ratas não audiogênicas (Nadg) e um grupo de ratas audiogênicas (Adg). O presente trabalho objetiva um estudo das alterações estruturais ocorridas no parênquima celular apenas das ratas Nadg.

b) ratas estimuladas por 2 dias;

c) por 4 dias;

d) por 7 dias;

e) por 7 dias, igualmente ao item anterior, acrescentando-se após o sétimo estímulo, no sétimo dia, mais 10 estímulos também de 3 minutos de duração, em intervalos de 2 minutos.

As poucas ratas que não tiveram convulsão audiogênica no primeiro teste, mas que vieram a tê-la em outros testes, durante os ensaios de estimulação para a constituição dos grupos (b), (c), (d) e (e), foram excluídas destes grupos, ficando estes com a constituição final e uniforme de 6 ratas em cada.

Em todos os grupos procedeu-se à concussão cervical e à retirada da gl. pineal imediatamente após o último estímulo, para se realizar o estudo histológico comparativo entre os animais submetidos às diferentes condições experimentais e o grupo controle.

RESULTADOS

Constituíram o grupo controle as ratas não estimuladas pelo som, das quais a presença de um corte típico da gl. pineal é visto na Fig. 1A, sendo possível reconhecer-se a distribuição lobular dos pinealócitos da região central da glândula; os de forma esférica ou ovóide situam-se no centro ou na periferia da célula.

Observações realizadas nos grupos experimentais indicam que já nos animais estimulados por um dia (Fig. 1B), a ocorrência de células com núcleos picnóticos é de 36% (Tab. 1) muito embora a distribuição lobular ainda se encontre preservada, característica do parênquima celular da gl. pineal. Observamos na Fig. 1C a gl. pineal de ratas estimuladas por dois dias; os núcleos estão totalmente densos e picnóticos, não se observam células normais e em algumas não há limites celulares. Nota-se a formação de edemas (espaço esbranquiçado) que é levemente mais acentuado nestes animais estimulados por dois dias do que no grupo de animais estimulados por um dia. A Fig. 1D corresponde aos animais estimulados por quatro dias, onde já não é mais possível reconhecer-se a característica lobular da distribuição dos pinealócitos, havendo um aspecto destrutivo mais intenso e que é tanto maior quanto se observa a gl. pineal das ratas estimuladas por sete dias, representada na Fig. 1E; neste grupo, todos os núcleos estão picnóticos e evidencia-se uma densidade celular de 3,6 células/1000 μ^2 , havendo portanto uma grande diminuição na densidade celular, quando se compara com o grupo controle. Nas ratas estimuladas por sete dias, sendo que no sétimo dia estimulou-se mais dez vezes consecutivas, a densidade celular ficou reduzida a apenas 1,6 células/1000 μ^2 , agravando-se ainda mais o aspecto destrutivo na gl. pineal (Fig. 1F).

TABELA I

Distribuição da densidade celular, nuclear normal picnótica nas glândulas pineais de ratas estimuladas durante diferentes dias, por uma campanha elétrica.

| | Densidade celular ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) | Densidade nuclear normal ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) | Densidade nuclear picnótica ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) | % |
|---------------------|--|---|--|-----|
| Controle | 23,4 \pm 0,5 | 23,4 \pm 0,5 | 0 | 0 |
| 1 dia | 11,1 \pm 0,7 | 8,4 \pm 0,5 | 2,7 \pm 0,2 | 36 |
| 2 dias | 13,6 \pm 0,6 | 0 | 13,0 \pm 0,6 | 100 |
| 4 dias | 9,4 \pm 0,4 | 0 | 9,4 \pm 0,4 | 100 |
| 7 dias | 3,6 \pm 0,1 | 0 | 3,6 \pm 0,1 | 100 |
| 7 dias + 10 est. | 1,6 \pm 0,03 | 0 | 1,6 \pm 0,03 | 100 |

Contagens feitas em campo microscópico de 7.850 μ^2 , na região central da glândula pineal. Densidade: número de elementos/1000 μ^2 . O número de glândulas usadas em cada grupo foi 6. P: nível de significância (< 0,001). $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$: média \pm 1 desvio padrão da média. %: percentagem de núcleos picnóticos. Aumento de 1.200 (imersão).

As determinações da densidade celular, nuclear normal e nuclear picnótica, observadas neste estudo histológico, são mostradas na Tab. 1, considerando-se as médias obtidas em seis glândulas por grupo. Estes dados revelam que nos animais estimulados por dois ou mais dias, os núcleos tornaram-se totalmente picnóticos, sendo ainda fato digno de salientar que, mesmo com apenas um estímulo, estes animais, quando comparados com o grupo controle, indicam possuir 36% de núcleos picnóticos, havendo assim a ocorrência de uma diferença altamente significativa (teste "t" de Student, $p < 0,001$).

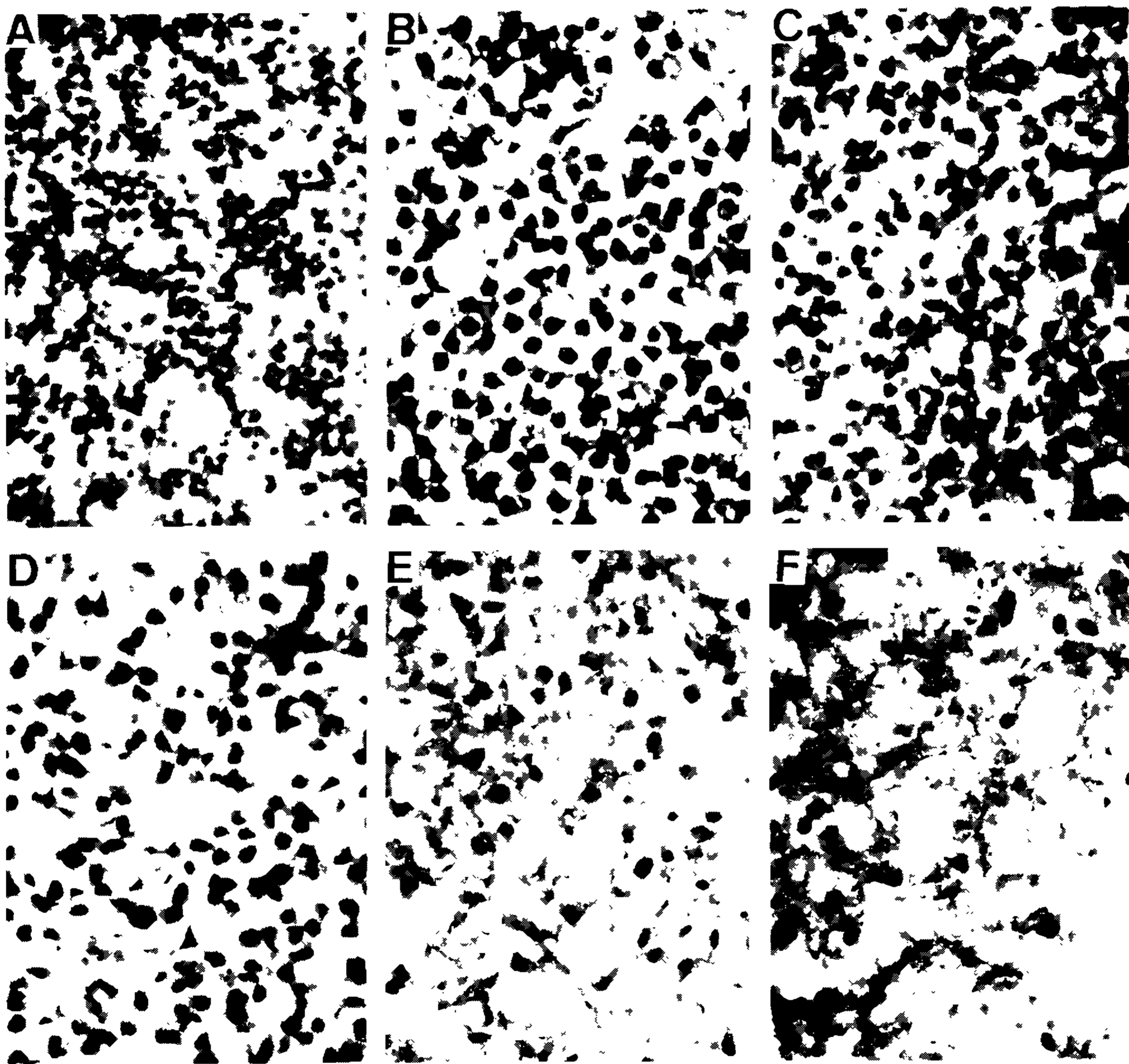


Fig. 1. Corte típico de glândula pineal de ratas submetidas ao estímulo sonoro (intensidade sonora em torno de 110 dB) obtido de uma campainha elétrica. Observação feita ao microscópio, em aumento total de 1.200 X, parte central da glândula, em coloração pela hematoxilina eosina. A – Grupo controle: ratas não submetidas à estimulação; B – Corte típico da gl. pineal de ratas submetidas a uma estimulação sonora de 3 minutos de duração; C – idem, por 2 dias; D – idem, por 4 dias; E – idem, por 7 dias; F – idem por 7 dias, acrescentando-se após o sétimo estímulo, no sétimo dia, mais 10 estímulos, também de 3 minutos de duração, em intervalos de 2 minutos.

DISCUSSÃO

Quay e Levine, 1959, mostraram, com o uso de colchicina em ratos recém-nascidos, que as células de um determinado lóbulo mantinham-se em iguais atividades mitóti-

cas e desenvolvimento citológico, mas que estes parâmetros diferiam dos encontrados em outros lóbulos. Em nosso presente estudo, os processos destrutivos foram observados em toda a extensão da glândula, portanto, não se observando em um lóbulo células mais destruídas que as de outros lóbulos, mesmo porque a coloração pela hematoxilina e eosina não é suficiente para identificar processos ou materiais citoplasmáticos do parênquima celular da gl. pineal; tornou-se difícil inclusive a identificação das células parenquimatosas, das neurogliais ou das mesodérmicas, ainda ao nível do grupo controle.

A comparação entre as figuras apresentadas indica haver um aumento de destruição de parênquima celular da gl. pineal, quando se aumentava o número das estimulações, sugerindo a existência de uma relação entre o estímulo sonoro e o aparecimento de aspectos destrutivos tão intensos nas gls. pineais destes animais. A possibilidade de existência de alterações celulares semelhantes em outras estruturas do Sistema Nervoso Central, merece ser também examinada a partir de metodologia semelhante.

Associado ao ruído proveniente da campainha elétrica (cerca de 110 dB), ocorre uma vibração da caixa; portanto admitimos também a possibilidade de que as alterações estruturais nas gls. pineais destas ratas traduzam o efeito da estimulação sonora ou sonoro-vibratória.

SUMMARY

The authors studied the effect of noise (110 dB), delivered by an electric bell, upon parenchima cells of pineal gland of albino female rats. Several experimental groups were previously formed and stimulated during 1, 2, 4 and 7 days. In addition another group was formed and stimulated during 7 days plus 10 additional stimulations of about 3 minutes each after the routine stimulations in the seventh day. The authors observed that a single stimulation of about 3 minutes was sufficient to determine alterations in the parenchima cells of the pineal of experimental animals; the changes were characterized by picnolysis in some groups, whereas in others groups picnolysis and interstitials vacuolizations were evidently increased directly with stimulation.

The results suggest that the sound stimulation has a destructible effect upon the parenchima cells of the pineal gland of the female albino rats.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos pelo serviço de microscopia do Laboratório de Fisiopatologia do IOC, sob a chefia do Professor Alexandre Alberto de Alencar, assim como aos seus inestimáveis incentivos e ao Sr. Ulisses Viana Barreto pelos serviços bibliográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, E., 1960. Some cytological observations on the fine structure of a mammalian organ. *Anat. Record*, 136 (2) : 328-329.
- AXELROD, J. & WEISSBACH, H., 1960. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Sci.* 131 (3409) :1312.
- AXELROD, J., WURTMAN, R. J. & SNYDER, S. H., 1965. Control of hydroxyindole-O-methyl transferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J. Biol. Chem.* 240 (2) :949-954.
- De ROBERTIS, E. & PELLEGRINO De IRALDI, A., 1961. Plurivesicular secretory processes and nerve endings in the pineal gland of the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10 (3) :361-372.
- LERNER, A. B., CASE, J. D., TAKAHASHI, Y., LEE, T. H. & MORI, W., 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Amer. Chem. Soc.* 80:(10) :2587.
- MINNEMAN, K. P. & WURTMAN, R. J., 1975. Effects of pineal compounds on mammals. *Life Sci.*, 17 (8) :1189-1200.
- PELLEGRINO De IRALDI, A. & De ROBERTIS, E., 1961. Action of reserpine on the submicroscopic morphology of the pineal gland. *Experient.*, 17 (3) :122-124.
- QUAY, W. B. & LEVINE, B. E., 1957. Pineal growth and mitotic activity in the rat and the effects of colchicine and sex hormone. *Anat. Record*, 129 (1) :65-77.
- REIDER, R. J., 1973. Comparative physiology: Pineal gland. *Ann. Rev. Physiol.*, 35 :305-328.
- UPSON, R. H., BENSON, B. & SATTERFIELD, V., 1976. Quantitation of ultrastructural changes in the mouse pineal in response to continuous illumination. *Anat. Record* 184 (3) 311-323.
- WURTMAN, R. J. & AXELROD, J., 1966. A 24-hour rhythm in the content of norepinephrine in the pineal and salivary gland of the rat. *Life Sci.*, 5 (7) :665-669.