

Luciana Gonçalves de Orange

**Repercussões metabólicas e imunológicas do uso do álcool na
lactação: estudo em ratos**

**Recife
2011**

Luciana Gonçalves de Orange

**Repercussões metabólicas e imunológicas do uso do álcool na
lactação: estudo em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição

Orientadora: Prof^a. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

**Recife
2011**

Orange, Luciana Gonçalves de

Repercussões metabólicas e imunológicas do uso do álcool na lactação: estudo em ratos / Luciana Gonçalves de Orange. – Recife: O Autor, 2011.

132 folhas: il., fig.,; 30 cm

Orientador: Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Alcoolismo. 2. Dieta. 3. Estado nutricional. 4. Imunidade. 5. Lactação. I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de. II. Título.

UFPE

613.2

CDD (20.ed.)

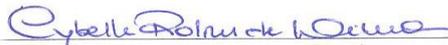
CCS2011-132

LUCIANA GONÇALVES DE

*Repercussões metabólicas e imunológicas do u
estudo em ratos*

Tese aprovada em 20 de maio de 2011

Membros da Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Cybelle Rolim de Lima
Universidade Federal de Pernambuco - Núcleo de



Prof^a. Dr^a. Francisca Martins Bion
Universidade Federal de Pernambuco - Departame



Prof^a. Dr^a Jairza Maria Barreto Medeiros
Universidade Federal da Bahia- Departamento de



Prof^a. Dr^a Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos
Universidade Federal de Pernambuco - Departame



Prof^a. Dr^a Ana Paula Rocha de Melo
Universidade Federal de Pernambuco - Departame

Recife
2011

A Edson e Lála , meus pais.

Rodrigo e Rebeca,meus irmãos.

César, grande companheiro!

Maria Clara, minha filha que tanto amo!

Francisca Bion, mestre e amiga.

Cybelle, minha grande amiga!

Agradecimentos

À **Deus**, pela certeza de estar ao meu lado nos momentos de fraqueza, me impulsionando a **NÃO DESISTIR**;

À **minha mãe, Lála**, pela paciência, aconselhamentos, disponibilidade e **AMOR INCONDICIONAL**, do qual só percebi a dimensão quando fui mãe;

Ao **meu Pai, Edson**, pelo incentivo e amor, que consigo perceber nos pequenos gestos;

Aos **meus irmãos, Rodrigo e Rebeca**, pela cumplicidade, amizade e amor. Vocês são meus grandes e para sempre **AMIGOS!!**

Aos **meus queridos avós** maternos, Narciso e Amara (**in memorian**), e paternos Valdomiro e Iraci (**in memorian**), que tanto me amaram e que foram tão marcantes na minha vida;

Ao **meu marido e grande companheiro César**, a quem tanto amo!! Desculpa pelas muitas noites de sono sozinho, quando eu estava a buscar os meus sonhos acordada.

À **minha filha Maria Clara**, que chegou na minha vida trazendo alegria e fazendo com que eu conhecesse o **AMOR PURO e VERDADEIRO!!!**

À **minha família** (tios, tias, primos, padrinhos e cunhados), pelas orações e torcidas valiosas nesta fase da minha vida...

À minha professora (para sempre) e orientadora (**oficiosa**), amiga e conselheira, Professora **Francisca Martins Bion**, exemplo de amor ao que faz!! Tenha certeza que seu incentivo e exemplo desde a graduação foram essenciais para minha chegada até aqui. Nunca a esquecerei...

À minha orientadora, Professora **Célia Castro**, pela confiança depositada, bem como a atenção dedicada;

Ao **Programa de Pós-graduação em Nutrição/UFPE**, na pessoa da professora **Mônica Osório (Coordenadora)**, através da qual agradeço a todos os professores, e na pessoa de **Neci Nascimento (Secretária)** e **Cecília Arruda**, por cujo intermédio agradeço a todos os funcionários;

Aos **professores e funcionários do Departamento de Nutrição (DN) e do Centro Acadêmico de Vitória (CAV)/UFPE**;

Ao Sr. Edeones França, veterinário do Biotério Central do Departamento de Nutrição, pela colaboração no manuseio dos animais;

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição/UFPE, especialmente Ana Maria França, pelo auxílio na fase experimental;

Ao Professor Nicodemos Teles Pontes Filho, pelo carinho, disponibilidade, atenção e conhecimentos repassados ao longo deste trabalho;

A Sidicley, funcionário do Departamento de Patologia, pela atenção dispensada à parte histológica desta pesquisa;

À Sr^a. Maria Cristina Malta, pela revisão linguística e documental do trabalho e enriquecimento do mesmo com suas colocações preciosas;

Ao Sr. José Paulino Ventura, exemplo de vida e profissionalismo, um grande amigo, presente em todas as horas na pesquisa experimental;

Às minhas estagiárias e hoje amigas, Ana Paula Belizário, Danielle Oliveira e Midori Sugaya, pela valiosa colaboração nas atividades experimentais;

À Pedrita Albuquerque e Patrícia Calado novas amigas e eternas companheiras do Grupo de Pesquisa Francisca Martins Bion (GPFBION), pelo carinho e atenção;

Às minhas amigas Keila Dourado, Michelle Galindo e Roberta Bento, pelo apoio, amizade e, acima de tudo, pelas muitas risadas que demos juntas, as quais me fizeram relaxar e esquecer as dificuldades;

*A Cybelle Rolim, pela LINDA e SÓLIDA amizade e companheirismo.
TE ADORO!! .*

Aos colegas do Doutorado que compartilharam os momentos de dedicação e aprendizado durante o curso;

*Aos **alunos** aos quais tenho tido a honra de ensinar, mas, sobretudo, de aprender!*

*Aos **amigos** que, por algum momento, entenderam minha ausência na busca pela realização de um sonho.*

A todos, a expressão de meu imenso agradecimento!

*Você não sabe o quanto eu caminhei pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu nem cochilei
Os mais belos montes escalei
Nas noites escuras de frio chorei....*

Toni Garrido (A estrada)

Resumo

Embora as mulheres que amamentam geralmente evitem o uso de drogas o padrão de consumo parece não ser alterado, devido à crença, em várias populações, de que o álcool é galactogênico. Este estudo objetivou avaliar as repercussões da ingestão materna de uma solução de aguardente de cana-de-açúcar durante a lactação, associada a uma dieta experimental, sobre os parâmetros nutricionais, metabólicos e imunológicos de seus descendentes. Ratas *Wistar* (N=12) e seus filhotes (N=72) foram randomizados em quatro grupos de 18 animais (9 machos + 9 fêmeas), de acordo com a dieta oferecida e/ou a exposição a uma solução de aguardente (15% v/v): GDE (grupo dieta experimental controle); GDEA (grupo dieta experimental álcool); GC (grupo dieta caseína); GCA (grupo dieta caseína álcool). Foram avaliados o peso das mães e filhotes, a ingestão hídrica materna, a produção de leite e o desenvolvimento dos lactentes. Ao final do experimento (21 dias de lactação), os animais foram sacrificados e coletados: sangue, para os parâmetros bioquímicos e imunológicos dos filhotes (proteína total, albumina, globulina, apartato amino transferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), Imunoglobulina A (IgA) e leucograma), timo e baço, para análise histomorfométrica. No 1º artigo, **“Immune response in newborn rats exposed to sugarcane alcohol associated to an experimental diet”**, foi avaliada a toxicidade da ingestão da solução de aguardente, associada à dieta experimental, sobre os parâmetros imunológicos. As ninhadas do GCA apresentaram uma média de peso superior aos demais. Quanto à contagem das células imunes, houve diferença entre os grupos. Os lactentes do GC apresentaram uma média superior, em todos os parâmetros, houve diferença entre os animais do GC e GCA. O baço foi o único órgão que demonstrou interação significativa entre os grupos e gêneros e esta diferença ocorreu no peso relativo do mesmo entre as fêmeas do GDEA e GC. As médias das áreas foliculares do baço foram mais elevadas no GDE do que no GDEA e se comprovou diferença entre esses grupos. No 2º artigo, **“Efeitos nutricionais e metabólicos em lactentes expostos a ingestão materna de aguardente associada a uma dieta experimental: estudo em ratos”**, foram analisados os efeitos da ingestão da solução de aguardente, associada à dieta experimental, sobre os parâmetros nutricionais e metabólicos. A dieta caseína (GC e GCA) promoveu maior peso entre as lactantes, apresentando diferença em relação aos demais grupos, aos 21 dias de lactação. O GCA apresentou aumento na produção de leite no 4º dia de lactação, em relação aos demais. Aos 21 dias, foi detectada diferença nos pesos das ninhadas, segundo o grupo, o GCA apresentou peso superior aos demais. AST e ALT foram mais elevadas nos animais expostos ao álcool. Houve redução das globulinas nos animais do GCA. Os achados permitem concluir que, tanto a dieta como a bebida alcoólica oferecida às lactantes neste estudo, modularam a resposta imune e o estado nutricional das mesmas e de seus descendentes de forma diferenciada, de acordo com o gênero.

Descritores: Alcoolismo, Dieta, Estado Nutricional, Imunidade, Lactação, Ratos Wistar.

Abstract

Although women who breastfeed generally avoid the use of drugs, the pattern of alcohol consumption does not appear to be altered due to the belief in various populations that alcohol increases milk production. The aim of the present study was to assess the repercussion of the maternal ingestion of a sugarcane alcohol solution during lactation associated to an experimental diet on nutritional, metabolic and immunological parameters in the offspring. Female *Wistar* rats (N=12) and their offspring (N=72) were randomized into four groups of 18 animals (9 males + 9 females) based on the diet offered and exposure to a sugarcane alcohol solution (15% v/v): experimental diet group (EDG); alcohol + experimental diet group (AEDG); casein diet group (CDG); and alcohol + casein diet group (ACDG). Weight of the mothers and offspring, maternal ingestion of water, milk production and development of the offspring were analyzed. At the end of the experiment (21 days of lactation), the animals were sacrificed. Blood was collected for biochemical and immunological parameters of the offspring [total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), immunoglobulin A (IgA) and leukogram). The thymus and spleen were collected for histomorphometric analysis. In the first article, **“Immune response in newborn rats exposed to sugarcane alcohol associated to an experimental diet”**, toxicity from the ingestion of the sugarcane alcohol solution associated to the experimental diet was assessed with regard to immunological parameters. The offspring in the ACG weighed more than those in the other groups. Differences were detected between groups with regard to cell counts. The offspring in the CDG had higher mean values for all parameters, with significant differences between the CDG and ACDG. The spleen exhibited a significant interaction between groups and genders; this difference occurred between relative weight of the females in the AEDG and CDG. Mean area of the follicles of the spleen was significantly greater in the EDG than in the AEDG. In the second article, **“Nutritional and metabolic effects in newborns exposed to maternal ingestion of sugarcane alcohol associated to an experimental diet: study on rats”**, the effects of the maternal ingestion of sugarcane alcohol associated to an experimental diet on nutritional and metabolic parameters in the offspring were analyzed. The casein diet (CDG and ACDG) promoted greater weight among the offspring, with significant differences in relation to the other groups after 21 day of lactation. The ACDG exhibited a greater increase in milk production on the fourth day of lactation in comparison to the other groups. At 21 days, differences in offspring weight were detected between groups, with the ACDG exhibiting greater weight than the other groups. AST and ALT were higher in the animals exposed to alcohol. There was a reduction in globulins in the ACDG. The findings allow the conclusion that both the diet and alcoholic beverage offered to the lactating females in the present study modulated the immune response and nutritional status of the mothers and their offspring in a differentiated manner depending on the gender of the offspring.

Descriptors: Alcoholism, Diet, Nutritional Status, Immunity, Lactation, *Wistar* Rats

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	13
<i>Hipótese.....</i>	<i>19</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>19</i>
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	20
<i>Consumo de alimentos e bebidas no Nordeste brasileiro.....</i>	<i>21</i>
<i>Etilismo feminino: uma realidade atual.....</i>	<i>24</i>
<i>Importância nutricional e imunológica do leite materno.....</i>	<i>27</i>
<i>Álcool na lactação: como e quanto afeta a saúde do neonato?.....</i>	<i>31</i>
CAPÍTULO 3 – MÉTODOS.....	38
<i>Estrutura geral.....</i>	<i>39</i>
<i>Limitações da pesquisa.....</i>	<i>39</i>
<i>Animais.....</i>	<i>38</i>
<i>Dietas.....</i>	<i>39</i>
<i>Delineamento dos grupos.....</i>	<i>40</i>
<i>Ingestões hídricas e etílicas dos animais.....</i>	<i>40</i>
<i>Crescimento e desenvolvimento.....</i>	<i>41</i>
<i>Produção de leite.....</i>	<i>41</i>
<i>Sacrifício dos animais e coleta das amostras de sangue.....</i>	<i>41</i>
<i>Dosagens Bioquímicas.....</i>	<i>42</i>
<i>Análises Imunológicas.....</i>	<i>42</i>
<i>Peso relativo e estudo histológico do timo e do baço.....</i>	<i>43</i>
<i>Análises estatísticas.....</i>	<i>43</i>
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS.....	44
Artigo I- “Immune response in newborn rats exposed to sugarcane alcohol associated to an experimental diet”.....	46
Artigo II – “Efeitos nutricionais e metabólicos em lactentes expostos a ingestão materna de aguardente associada a uma dieta experimental: estudo em ratos”.....	73
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS.....	105
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	121
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	122
ANEXO B – Documentação de submissão do artigo I.....	123
ANEXO C – Normas para publicação na revista <i>Alcohol</i>	124
ANEXO D- Documentação de submissão do artigo II.....	125
ANEXO E- Normas para publicação na Revista Paulista de Pediatria.....	126

O alcoolismo é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, um tema sempre atual, devido às suas consequências socioeconômicas, além das repercussões tóxicas sobre órgãos e tecidos, desencadeando diversos mecanismos deletérios no organismo (GUERRINI; THOMSON; GORLING, 2007).

O consumo de álcool tem imenso impacto como causa de adoecimento e morte no mundo, relacionando-se, ao mesmo tempo, a diversas consequências sociais negativas. Constitui importante causa de morbi-mortalidade para as nações mais pobres; terceiro fator de risco para problemas de saúde na maioria das nações ricas; principal fator relacionado a adoecimento e morte na maioria dos países pertencentes ao grupo cujas economias se encontram em grau intermediário de desenvolvimento (MELONI; LARANJEIRA, 2004).

No Brasil, o alcoolismo determina mais de 10% de toda a morbi-mortalidade ocorrida neste país (FONTES; FIGLIE; LARANJEIRAS, 2006). O II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas, realizado em 2005, pelo Cebrid (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas), apontou que 12,3% das pessoas pesquisadas, com idades entre 12 e 65 anos, preenchem critérios para a dependência do álcool, e cerca de 75% já beberam, pelo menos uma vez na vida. Vale ressaltar, ainda, que, neste mesmo estudo, os autores identificaram que do total de dependentes, 6,9% eram do sexo feminino (CARLINI et al., 2007; KACHANI, 2008).

O etanol é uma molécula que se move facilmente através das membranas celulares, alcançando rapidamente um equilíbrio entre o sangue e os tecidos (BURGOS; BION; CAMPOS, 2004). Esta substância atinge todos os tecidos do organismo e afeta a maioria das funções vitais, por ser uma molécula pequena, solúvel, tanto em meio aquoso como lipídico (LIEBER, 1997).

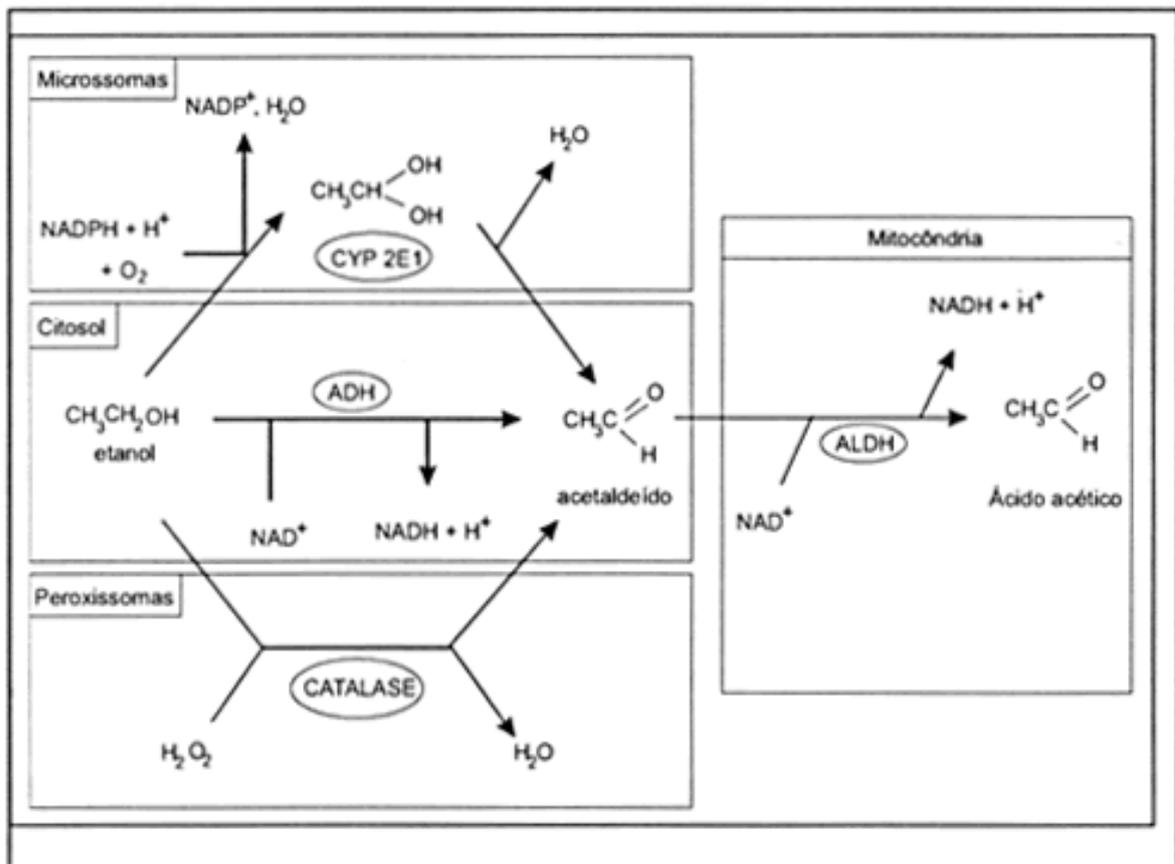
O consumo de grandes quantidades de bebidas alcoólicas provoca alterações metabólicas e patológicas nos mais variados sistemas do organismo humano: altera as funções do sistema nervoso, digestório, alterando o metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas e, particularmente, os aspectos nutricionais de órgãos, como pâncreas, estômago e intestino, além de afetar o sistema imune dos indivíduos, aumentando assim o número de doenças infecciosas de forma aguda e/ou crônica (HIRATA; HIRATA, 1991; AHMED, 1995; SZABO, 1998; ROMEO et al., 2007a; LAU et al., 2009).

O álcool é uma fonte de energia diferente de todas as outras, pois não pode ser estocado no organismo. Como uma substância tóxica, deve ser eliminado imediatamente (KACHANI; BRASILIANO; HOCHGRAF, 2008). Assim, o álcool tem prioridade no metabolismo, alterando outras vias metabólicas, incluindo a oxidação lipídica, o que favorece

o estoque de gorduras no organismo, que se depositam preferencialmente na área abdominal (LANDS, 1993; SUTER; HASLER; VETTER, 1997; SUTER, 2005). A participação calórica do álcool depende de sua forma de metabolização. A principal e mais usual via de metabolização do álcool é aquela que envolve a enzima álcool desidrogenase (ADH), cuja função é a oxidação do etanol em acetaldeído. Essa via utiliza o NAD (dinucleotídeo de nicotinamida-adenina) como aceptor de hidrogênio, que é reduzido a NADH. Essa reação está associada com um alto fornecimento energético proveniente do NADH na formação de 16 ATP/mol de etanol via fosforilação oxidativa. A disponibilidade de NAD e a atividade mitocondrial limitam o uso dessa via, mais utilizada por bebedores sociais (MITCHELL; HERLONG, 1986; SUTER; HASLER; VETTER, 1997; AGUIAR; DA SILVA; BOAVENTURA, 2007).

Já a via que assume grande relevância nos alcoolistas é aquela do SMOE (Sistema Mitocondrial de Oxidação do Etanol), presente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, que utiliza o citocromo P-450, a NADPH-citocromo redutase e os fosfolipídios, tendo como aceptor de hidrogênio o NADP. Essa via tem maior importância em indivíduos que consomem o álcool cronicamente, porém à custa de gasto de energia na forma de ATP. Utiliza o oxigênio e o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na sua forma reduzida) não gerando componentes formadores de energia, como o NADH. É, portanto, uma reação que consome energia, em vez de gerá-la (MITCHELL; HERLONG, 1986; AGUIAR; DA SILVA; BOAVENTURA, 2007).

Existe uma terceira via de metabolização do etanol que possui pequena participação no processo, sendo responsável por apenas 10% do álcool ingerido. Ocorre no interior dos peroxissomas, através de catalases, e, semelhantemente ao Smoe, não forma ATPs (AGUIAR; DA SILVA; BOAVENTURA, 2007).



Fonte: BERMOND; TOSE, 2000

Todas as três vias têm como produto final o acetaldeído, que será então oxidado em acetato e água pelo aldeído desidrogenase (ALDH), enzima presente na matriz e na membrana mitocondrial externa, no microsomo e no citosol dos hepatócitos. Na fase final do metabolismo, o acetato é convertido em coenzima A, com desdobramento de ATP para AMP (adenosina monofosfato). O AMP poderá então ser convertido novamente em ATP ou em purinas e ácido úrico. O acetil coenzima A, por sua vez, entrará no Ciclo de Krebs, transformando-se em dióxido de carbono e água (AGUIAR; DA SILVA; BOAVENTURA, 2007). Assim, o acetato, metabólito final da degradação do álcool, é uma ótima forma de energia, inibindo a oxidação lipídica e causando, entre outras coisas, a esteatose hepática e a obesidade (SUTER; HASLER; VETTER, 1997).

Por outro lado, desde a década de 50, há linhas de pesquisa que demonstram interesse científico na investigação dos benefícios do consumo moderado de bebidas alcoólicas para o organismo e a relação entre o consumo do álcool e resposta imune no desenvolvimento de processos infecciosos e inflamatórios, os quais parecem ainda contraditórios e não

completamente esclarecidos (ROMEO et al., 2007a). Evidências da literatura sugerem que alguns compostos como: polifenóis, vitaminas e antioxidantes presentes em bebidas alcoólicas fermentadas, como a cerveja ou o vinho, previnem a supressão do sistema imune ou desencadeiam um efeito protetor para o indivíduo (GONZÁLES-GROSS; LEBRÓN; MARCOS, 2000; PERCIVAL; SIMS, 2000.). É importante salientar que essas pesquisas que demonstram benefícios imunológicos com o consumo moderado do álcool têm se reportado sempre à população adulta (ROMEO et al., 2007a).

Os mecanismos pelos quais o álcool pode afetar a imunidade já são bem conhecidos, como: prejuízo na habilidade das células brancas do sangue em migrar para os locais de doença ou infecção, indução de anormalidades funcionais dos linfócitos T e B, células Natural Killer, monócitos e macrófagos, além de alteração na produção de citocinas (BAUTISTA, 2001; DEACIUC, 1997; SZABO, 1999). Entretanto, esses efeitos deletérios no sistema imune são constatados em estudos com humanos e animais, quando são consumidas altas concentrações de álcool. Porém, quando os teores de álcool são menores, seu consumo parece aumentar a resposta imune (BUDEC et al., 1992; MENDENHALL et al., 1997; COOK, 1998; ROMEO et al., 2007b; c). Este efeito aumentado parece depender não só da concentração de etanol, como também da quantidade ingerida, duração e padrões de consumo dessas bebidas (ROMEO et al., 2007a).

Resultados de estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que o consumo do álcool representa na população masculina, 5,6% de todas as mortes que ocorrem no planeta e 0,6% das mortes ocorridas entre as mulheres, concluindo-se que o álcool é responsável por 3,2% da mortalidade global (MELONI; LARANJEIRA, 2004).

O consumo de bebidas alcoólicas pelo sexo feminino vem aumentando dramaticamente, nos últimos 10-20 anos. Com a semelhança das atividades socioeconômicas das mulheres à dos homens, o consumo de álcool entre estes dois gêneros tende a convergir, o que tem sido constatado nas últimas décadas. Este consumo crescente passou a constituir uma preocupação no campo da saúde e, portanto, a demandar estudos para melhor conhecer os vários aspectos e mecanismos envolvidos. A partir da década de 90 o tema passou a ser objeto de maior curiosidade científica, o que fez aumentar o número de pesquisas (MONTEIRO, 1996; KERR-CORRÊA, et al., 2008). A prevalência do consumo do álcool por mulheres no Brasil, sempre foi muito discutida e seus dados muito conflitantes, uma vez que o preconceito histórico acerca do problema dificulta o reconhecimento da dependência (BRASILIANO, 2005; NOBREGA; OLIVEIRA, 2005).

No que concerne ao consumo de bebidas alcoólicas em períodos específicos da vida da mulher, como a gestação, estima-se que 20% das gestantes fazem uso de álcool durante a gravidez (PASSINI-JUNIOR, 2005). Uma menor proporção de mulheres continua bebendo ou consumindo outras drogas depois da gestação ser diagnosticada. Entre os agentes teratogênicos, o álcool é o mais largamente utilizado, tendo um número de consumidores superior ao de qualquer outro tóxico (KOREN; NULMAN, 1994; ERJA, 2003). Estas alterações compreendem desde a interrupção da gravidez até o aparecimento de deformações fetais que caracterizam a “Síndrome Alcoólica Fetal”. No entanto, com relação aos efeitos da ingestão alcoólica materna durante a lactação e as possíveis alterações sobre a prole, ainda há muito o que se investigar (TAVARES-DO-CARMO; NEVES; FACCIN, 1995; BURGOS et al, 2004; OJEDA et al., 2009).

Em 1983, o álcool já era catalogado como droga que passa ao leite materno, necessitando abolir sua ingestão durante todo o período de amamentação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC, 1983; VILALPANDO, 1993). Entretanto, tradicionalmente, no Brasil, o álcool tem sido recomendado a lactantes, especialmente a cerveja preta, como “lactagôgo”, para melhorar a amamentação, proporcionando calorias e líquidos adicionais (CUNHA, 1923; JASON, 1991; MENELLA; BEAUCHAMP, 1993; VITOLO et al. 1994; WHO, 1998). Apesar de mulheres que amamentam demonstrarem usar menos drogas, seu padrão de consumo parece não diminuir neste período. Aproximadamente 10% delas relatam beber duas ou mais doses de álcool diariamente (LITTLE, 1989). Estudos mais recentes demonstraram que apenas 5% seguiam este padrão apresentado após o parto, porém 37% relataram *binge drinking* frequentes (LITTLE; NORTHSTONE; GOLDING, 2002)

É fato indiscutível que o consumo de bebidas alcoólicas entre as mulheres tem se intensificado nas últimas décadas, constituindo um tema relativamente pouco estudado, com inúmeras implicações ainda por desvendar. Embora tenha havido um incremento nas campanhas educativas, alertando contra os malefícios físicos e sociais do consumo do álcool no Brasil, ainda são escassas as pesquisas que investiguem a prevalência deste consumo entre as mulheres, em especial no Nordeste brasileiro, como também há necessidade de estudos experimentais e clínicos que avaliem as consequências do mesmo.

Toda a fundamentação teórica relativa ao que foi descrito e ao que será relatado ao longo do trabalho será detalhada a seguir. Pretendemos, portanto, solidificar nossa hipótese com o que há de mais recente e aprofundado sobre o tema, na literatura.

Vale salientar que esta abordagem do alcoolismo durante a lactação é sumamente importante, sobretudo levando-se em conta o diferente tipo de bebida alcoólica objeto do

estudo (aguardente de cana-de-açúcar), bem como a dieta, composta por uma mistura de alimentos regionais, ofertada aos animais.

Assim, considera-se importante a realização de pesquisa experimental que possa fornecer alguns subsídios à elucidação de aspectos ainda controvertidos, como forma de contribuição científica para aprofundar os conhecimentos sobre o assunto, colaborando inclusive para a orientação das lactantes expostas ao consumo de álcool.

Hipótese

A ingestão de solução de aguardente, por ratas lactantes, associada a uma dieta experimental, prejudica o estado nutricional das mesmas, bem como o crescimento e desenvolvimento da sua prole diminuindo a imunocompetência dos seus descendentes.

Objetivos

Geral

Avaliar as repercussões da ingestão materna de uma solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), durante a lactação, associada a uma dieta representativa do Nordeste brasileiro, sobre os parâmetros metabólicos e imunológicos de seus descendentes.

Específicos

Avaliar a influência da ingestão de uma bebida alcoólica associada a uma dieta representativa do Nordeste brasileiro sobre:

- O estado nutricional de ratas lactantes
- O crescimento e desenvolvimento dos seus filhotes, através do peso e alguns marcadores de desenvolvimento, bem como de algumas variáveis bioquímicas;
- A resposta imune dos lactentes, através de alguns parâmetros imunológicos, como: leucograma, titulação de anticorpos e da histomorfometria do timo e baço.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Sabe-se, há muito tempo, que o consumo do álcool é responsável por aumentar a injúria e levar à morte (PEARL, 1926; SJOGREN et al., 2000). Pesquisas têm contribuído substancialmente para o entendimento das relações entre as bebidas e doenças específicas, e mostrado que a relação entre consumo de álcool e doença é complexa e multidimensional. O uso prolongado do álcool leva a múltiplas anormalidades clínicas, bioquímicas e eletrofisiológicas, que estão associadas com doenças do fígado, sistema neuromuscular, coração e cérebro (SPENCER et al., 1986; MARIN-LEON; OLIVEIRA; BOTEGA, 2007).

O álcool é uma substância psicoativa, de consumo liberado e incentivado pela sociedade (ELBREDER et al., 2008). A mortalidade e a limitação funcional causadas pelo consumo de bebidas alcoólicas superam as ocasionadas pelo tabaco, correspondendo a 3,2% da mortalidade global, sendo 5,6% deste valor para homens e 0,6% para mulheres (MELONI; LARANJEIRA, 2004).

Existem diferenças no consumo de álcool relacionadas ao gênero, sendo o uso abusivo mais frequente entre os homens. No entanto, há estudos apontando o aumento deste consumo entre as mulheres, se iniciando de maneira mais precoce, mostrando que a diferença entre os gêneros tem diminuído progressivamente (PALA, 2004; CESAR, 2006).

A realidade internacional e nacional, numa análise dos estudos sobre a dependência química, evidencia que estes estão quase exclusivamente voltados para a população masculina, banalizando-se a questão do gênero (ELBREDER et al., 2008).

Estimativas acerca da prevalência do alcoolismo em homens e mulheres variam, de acordo com o tempo e a população estudada. Em relação ao sexo feminino essa questão é discutível, especialmente pelo fato de que a mulher pode ser melhor diagnosticada, devido ao enfrentamento da vergonha em buscar tratamento especializado, o que pode ocasionar falsificação dos resultados da prevalência (BLUME, 1986; HOCHGRAF, 1993; KACHANI, 2008).

Consumo de alimentos e bebidas no Nordeste brasileiro

Hábitos alimentares são as formas como os indivíduos ou grupos selecionam, consomem e utilizam os alimentos disponíveis, incluindo os sistemas de produção, armazenamento, elaboração, distribuição e consumo de alimentos (SOUZA; HARDT, 2002).

Apesar da diversidade dos hábitos alimentares entre os povos, culturas e camadas sociais, em distintos períodos históricos, o valor nutricional da dieta depende fundamentalmente das possibilidades econômicas da família para acesso aos alimentos (ARRUDA, 1981).

Historicamente a cultura alimentar do Brasil teve seu nascimento na colonização portuguesa, sofrendo a influência de três raças: a branca, com a chegada dos portugueses nas terras brasileiras, a indígena, o encontro com o povo local e a negra, vinda com os escravos trazidos como mão-de-obra para a exploração (FREYRE, 2001).

Em relação às alterações na estrutura de consumo e hábitos alimentares da população brasileira, a análise temporal de alguns indicadores obtidos das Pesquisas Orçamentárias Familiar (POFs) conduzidas pelo IBGE, apontam mudanças bastante significativas (VASCONCELOS, 2007). Assim, por exemplo, a despesa mensal familiar de consumo alimentar entre 1975 e 2003 passou, respectivamente, de 33,91% para 20,75% do total de despesas. Analisando as variações da quantidade anual per capita de uma lista de vinte alimentos selecionados, observa-se que, entre 1975 e 2003, importantes alimentos básicos tais como arroz polido, feijão, farinha de mandioca, macarrão, pão francês, batata inglesa, carne bovina, frango, leite pasteurizado, café moído e açúcar apresentaram sensíveis reduções das quantidades adquiridas. Além disso, apresentaram importante aumento as quantidades adquiridas de alimentos como abóbora, farinha de trigo, iogurte, refrigerante, água mineral, alimentos preparados e óleo de soja. Outro importante indicador diz respeito ao percentual de despesas com alimentação fora do domicílio, cuja participação tem historicamente sofrido uma expressiva elevação. De acordo com os resultados da POF 2002-2003, as despesas com alimentação fora do domicílio correspondiam a 24,05%, sendo 25,74% na área urbana e 13,07% por cento na área rural. Na distribuição por regiões geográficas, o maior percentual de despesas com alimentação fora do domicílio verificou-se no Sudeste (26,91%), seguido das regiões Centro-Oeste (24,46%) e Sul (23,35%), enquanto os menores valores verificaram-se no Nordeste (19,52%) e Norte (19,10%) (IBGE, 2004).

Batista-Filho e Miglioli (2006), analisando através de uma revisão bibliográfica, o perfil qualitativo dos alimentos componentes dos diversos grupos no Estado de Pernambuco,

encontraram que de modo geral, as gorduras (todos os tipos), açúcar e café apareciam como os componentes de frequência mais elevada (acima de 80%) de todos itens alimentares para esse estado, principalmente entre as famílias do interior urbano e rural. Já o feijão no meio rural, foi registrado no recordatório diário de 95,7% das famílias avaliadas.

Ressalta-se que em relação aos alimentos de origem animal, o consumo de leite *in natura* predomina no interior rural e urbano, caindo consideravelmente na Região Metropolitana do Recife (RMR). No que diz respeito às carnes, a bovina (fresca ou na forma de charque) aparecem como as de consumo mais elevado, seguida da carne de galinha. O ovo teve o seu menor consumo no meio rural (17,3%) (BATISTA-FILHO; ROMANI, 2002).

Entre as leguminosas, os feijões aparecem com maior consumo predominantemente na zona rural (95,7%) em relação a RMR (82,6%). Quanto aos cereais, o arroz, em termos de frequência diária, aparece com a maior participação no consumo do grupo, seguido do pão e do milho (BATISTA-FILHO; ROMANI, 2002).

Quanto aos alimentos protetores: legumes, verduras e fruta, de modo geral observou-se que o consumo dos principais legumes e verduras é menor, do que as demais áreas. Já o consumo diário de frutas é bem mais baixo do que o de legumes e verduras no meio urbano e, principalmente no meio rural. A banana e a laranja aparecem como as frutas de preferência mais rotineira (BATISTA-FILHO; ROMANI, 2002).

Embora as bebidas alcoólicas não sejam consideradas alimentos, elas fazem parte dos hábitos alimentares de diversas populações. As bebidas alcoólicas são tão antigas quanto a humanidade e tão numerosas como as etnias. Fenícios, assírios, babilônios, hebreus, egípcios, chineses, gregos, romanos e germanos mencionaram-nas e cada povo praticamente tem as suas bebidas específicas, a partir das fontes naturais próprias de açúcares e amiláceos, como frutas, cana, milho, trigo, arroz, batata, centeio, aveia, cevada e mesmo raízes e folhas. Dependendo do país e da disponibilidade de matérias-primas, produz-se em maior quantidade um determinado tipo de bebida alcoólica característica da região, como o uísque, nos Estados Unidos e na Escócia, a vodca, na Rússia, o saquê, no Japão, o rum, em Cuba, e a aguardente, no Brasil, entre outras (REIS; RODRIGUES, 2003).

A aguardente de cana-de-açúcar é um tipo de bebida produzida no Brasil que recebe a denominação típica e exclusiva de cachaça e apresenta graduação alcoólica de 38 % vol (trinta e oito por cento em volume) a 48% vol (quarenta e oito por cento em volume) a 20°C (vinte graus Celsius), sendo obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L⁻¹, expressa em sacarose. Quando a quantidade adicionada de açúcares é superior a esta e

inferior a 30g/L^{-1} , a bebida passa a ser denominada cachaça adoçada (BRASIL, 2005). Assim, a cachaça é, sem margem para contestação, a bebida típica do povo brasileiro, haja vista ser o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, matéria-prima bastante utilizada em sua produção, seguido pela Índia e Cuba (BARROS; RIBEIRO; ROLIM, 1989).

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence à classe das Monocotiledôneas, família Poaceae (Gramineae), gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum* spp, cuja composição química é de: 65% a 75% de água, 11% a 18% de sacarose, 0,2% a 1,0% de glicose, 0,0% a 0,6% de frutose, 8% a 14% de cinzas e o restante constituído por compostos nitrogenados, minerais, gorduras, ceras e compostos pécticos (SANTANA, 1995).

A produção da cachaça no Brasil ocorre de uma forma pulverizada, em quase todos os estados. Segundos dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), existem cerca de 1.800 estabelecimentos produtores de cachaça registrados e mais de 30 mil produtores, em todo o país. A maior parte está localizada nos estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais, que respondem por cerca de 75% da produção nacional (BRASIL, 2005).

A produção de aguardente, no Brasil, destina-se quase totalmente ao mercado interno, em que o consumo atende a um hábito amplamente difundido, especialmente entre a população de baixo poder aquisitivo, visto ser uma bebida de preço relativamente baixo (LIMA NETO et al. 1994). Entretanto, Pataro et al. (2002) relataram que, atualmente, a aguardente está presente em todos os segmentos sociais, no Brasil. Paradoxalmente, a parcela de produção destinada ao mercado externo é pouco significativa (LIMA NETO et al. 1994), embora em ascensão, e vem aos poucos conquistando o paladar internacional de bebidas destiladas, pelo seu sabor especial e exótico (SOUSA, 2005). Em 2003, foram exportados 5,2 milhões de litros de aguardente e cachaça, e em 2004 esse volume aumentou para 10,2 milhões de litros (BRASIL, 1974), sendo os principais países importadores: Alemanha, Portugal e Estados Unidos (LÓPEZ, 2004). Em 2008 foram exportados US\$ 16.418.978,00 (11.092.088 litros) para aproximadamente 60 países (CBRC, 2009).

Sem dúvida alguma, a aguardente é muito apreciada, por possuir aroma e sabor característicos, e não há exagero em afirmar que não é possível o conhecimento da cultura do povo brasileiro sem a inclusão da “branquinha”, tão significativa é a sua presença no dia-a-dia desta população, independentemente de classe social (LIMA, 2010).

Etilismo feminino: uma realidade atual

A diferença de gênero tem sido extensivamente estudada como um fator que influencia o consumo do álcool (JUÁREZ; TOMASI, 1999). O metabolismo do etanol constitui um dos principais motivos para diferenciar os padrões do consumo do álcool entre machos e fêmeas, bem como as diferenças de composição corporal, entre os gêneros (KALANT, 1996; LANCASTER, 1994). Embora, no Brasil, da mesma forma que em diversos países estudados, a prevalência da dependência de álcool seja muito menor no sexo feminino, é importante lembrar que as mulheres têm maior sensibilidade ao álcool, maior progressão à toxicidade alcoólica e mortalidade aumentada em níveis de consumo mais baixos em relação aos homens (BRIENZA; STEIN, 2002; REIS; RODRIGUES, 2003; AGUIAR; DA SILVA; BOAVENTURA, 2007)

O consumo abusivo do álcool acarreta consequências, para a mulher, em vários aspectos físicos, que incluem a miocardiopatia, miopatia, hepatite alcoólica, que quase sempre progride para cirrose hepática; tem também consequências sobre o ciclo reprodutivo, como a inibição da ovulação, diminuição da fertilidade e vários problemas ginecológicos e obstétricos (NÓBREGA; OLIVEIRA, 2005). O atendimento ao alcoolismo feminino implica o conhecimento, dentre outros fatores, de suas repercussões sobre a esfera ginecológica, obstétrica e endócrina (NOVAES et al., 2000).

A maioria dos estudos experimentais sobre ingestão de etanol, em ratos, têm sido realizados em animais do sexo masculino; isto porque pesquisas em ambos os sexos, em diferentes idades, têm constatado que as fêmeas sempre consomem mais álcool que os machos (BELL et al., 2004; ORANGE; BION; LIMA, 2009). Essas diferenças, relativas ao maior consumo do etanol pelas fêmeas, têm sido observadas em modelos animais de alcoolismo, ao contrário do que ocorre em humanos, em que os homens, na maioria das vezes, ingerem maiores quantidades de etanol que as mulheres, nas amostras de alcoolistas (WILSNACK et al., 2000; SIMAO et al, 2002; KERR-CORREA et al., 2008).

Em períodos reprodutivos da vida da mulher, como gestação e lactação, o consumo de bebidas alcoólicas deve ser desaconselhado, o que é ratificado pelos achados clínicos e experimentais sobre esta prática (BURGOS et al., 2004; FABRI, 2002). Historicamente, o álcool tem sido relacionado a efeitos adversos sobre o recém-nascido (RN) (BURGOS et al., 2002). Citações bíblicas já referiam proibições ao consumo de cerveja e vinho por gestantes, sendo ainda norma proibitiva em algumas cidades, na Antiguidade, o brinde nupcial com

bebidas alcoólicas, para prevenir efeitos teratogênicos já na concepção (STREISSGUTH et al., 1980; KACHANI, 2008).

Estima-se que aproximadamente 20% das mulheres fazem uso de álcool durante a gravidez (PASSINI JÚNIOR, 2005). Mesmo variando em forma e intensidade, o uso frequente do álcool entre as mulheres tem aumentado significativamente, nos últimos anos (EBRAHIM et al., 1998; ROOM; BABOR; REHM, 2005). Em decorrência disso, tem sido observado aumento dos efeitos negativos do chamado consumo “baixo a moderado”, durante a gestação (CHANG, 2001). As mulheres que consomem álcool de forma moderada têm maior chance de parar ou reduzir seu consumo, durante o período de gestação; porém, entre as “grandes bebedoras”, dois terços diminuem o consumo e um terço continua a abusar do álcool, durante toda a gestação (ERJA, 2003).

Este é um fato preocupante, principalmente quando se sabe que o consumo do álcool durante a gestação envolve grande risco, devido à embriotoxicidade e teratogenicidade fetal que a ele estão relacionadas, transformando-se em sério problema de saúde pública (FABRI, 2002). Fiorentin e Vargas (2006), entrevistando gestantes que realizavam o programa de pré-natal em unidade básica distrital de saúde no interior paulista, constataram que 35% consumiam bebidas alcoólicas, embora acreditassem que o consumo do álcool poderia trazer prejuízos para a mãe e para o feto. Estudo mais recente também encontrou um consumo de bebida alcoólica elevado (40,6%, em algum período da gestação, e 10, 1% até o final da gestação), em gestantes atendidas em maternidades do Rio de Janeiro (MORAES; REICHENHEIM, 2007).

A maioria das gestantes tem algum conhecimento de que o álcool não deve ser ingerido na gestação, embora não saiba exatamente quais as consequências desta prática (SANDRE-PEREIRA et al., 2000; FIORENTINI; VARGAS, 2006; MORAES; REICHENHEIM, 2007). O mesmo não ocorre na lactação, uma vez que a cerveja, tradicionalmente, e, em menor grau, o vinho, são recomendados como galactagogos, fontes de vitaminas do complexo B e capazes de provocar relaxamento no binômio mãe/filho (CLARK, 1984; ICHISATO; SHIMO, 2001; KACHANI; BRASILIANO; HOCHGRAF, 2008).

Apesar de mulheres que amamentam demonstrarem usar menos drogas, seu padrão de consumo parece não diminuir neste período. Aproximadamente 10% delas relatam que bebem duas ou mais doses de álcool diariamente (LITTLE et al., 1989). Estudo mais recente realizado no Brasil encontrou uma prevalência bem próxima (11,1%), sendo que, dentre as que afirmaram usar esta substância (n=56), 80,3% (n=45) estavam amamentando (DEL CIAMPO et al., 2009). Esses achados diferem de estudos realizados em outros países, onde a

prevalência de consumo de bebidas alcoólicas é bem mais elevada entre as lactantes, chegando a 80%, como na Noruega (ALVIK; HALDORSEN; LINDERMANN, 2006; BRESLOW et al., 2007; GIGLIA; BINNS, 2007). Esses dados revelam a pouca atenção dispensada, pelos profissionais de saúde, no lidar com a problemática do uso de álcool na gestação e lactação. Faz-se necessário o oferecimento de cursos de conscientização e capacitação em álcool e drogas, para os profissionais envolvidos em programas de acompanhamento pré-natal, como forma de aumentar a assistência integral à saúde da gestante e da nutriz (FIORENTIN; VARGAS, 2006; DEL CIAMPO et al., 2009).

A literatura ressalta ainda que, apesar da dependência alcoólica entre as mulheres apresentar um curso diferente, isto não justifica o pior prognóstico em relação aos homens, e ainda que a recuperação, no que se refere ao tempo de tratamento, é semelhante nos dois sexos. Quando a mulher procura tratamento, tem maior probabilidade de recuperação, na medida em que percebe a gravidade do problema e procura maneiras para enfrentá-lo, mesmo existindo poucos serviços que oferecem atenção específica para elas (HOCHGRAF, 1993; NOBREGA; OLIVEIRA, 2005).

Importância nutricional e imunológica do leite materno

O leite materno propicia uma nutrição de alta qualidade para a criança, promovendo seu crescimento e desenvolvimento (GIUGLIANI, 2000). Devido a este crescimento diferenciado das crianças amamentadas em relação às aquelas que utilizam o leite artificial, a OMS empenhou-se na elaboração de novos padrões de referência de crescimento, que substituíram a curva do *National Center for Health Statistics (NCHS)* (WHO, 1995; VICTORA et al., 1998), a partir de dados coletados em seis diferentes países, inclusive o Brasil (ONIS et al., 2004; 2007).

O aleitamento materno representa uma das experiências nutricionais mais precoces do recém-nascido, dando continuidade à nutrição iniciada na vida intrauterina. A composição do leite materno, em termos de nutrientes, difere qualitativa e quantitativamente das fórmulas infantis. Além disso, vários fatores bioativos estão presentes no leite humano, entre eles hormônios e fatores de crescimento que vão atuar sobre o crescimento, a diferenciação e a maturidade funcional de órgãos específicos, afetando vários aspectos do desenvolvimento (HAMOSH, 2001; HIRAI et al., 2002; WAGNER, 2002).

Após o nascimento, o crescimento do lactente é influenciado pela genética e pela nutrição (SMITH et al., 1976). As necessidades nutricionais do lactente refletem as taxas de crescimento, a energia gasta na atividade, as necessidades metabólicas basais e a interação dos nutrientes consumidos (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

A composição nutricional do leite materno é elaborada para fornecer a energia e os nutrientes necessários, nas quantidades apropriadas. Contém fatores imunológicos específicos e não específicos que sustentam e fortalecem o sistema imunológico do recém-nascido e, dessa forma, protegem o corpo contra certas infecções (ODDY, 2001).

Os componentes proteicos do leite materno são representados pela lactalbumina, caseína, lactoferrina, seroalbumina, lisozima e imunoglobulinas. Dentre os aminoácidos encontrados destacam-se a cistina e a taurina; o primeiro, considerado essencial para o neonato, e o segundo, participando na formação do tecido nervoso dos mesmos (FERREIRA et al., 1998).

No que diz respeito aos lipídios, o leite humano é rico em ácidos linoleico, palmítico, oleico e colesterol, o qual é usado na formação da mielina. A síntese lipídica na glândula mamária sofre a influência da concentração de prolactina, sendo observado aumento na oferta lipídica em consonância com o aumento sérico da prolactina na mãe (LAURINDO, 1992).

A lactose é o principal hidrato de carbono e coexiste com pequenas quantidades de galactose, glicose, oligossacarídeos e glicoproteínas. A lactose, depois de sofrer hidrólise, facilita a absorção de cálcio e fósforo na luz intestinal, evitando o raquitismo nos lactentes. Dentre as glicoproteínas existentes, destaca-se o fator bífido, que promove um ambiente propício ao crescimento de *Lactobacillus bifidus*, acidificando o pH do lúmen intestinal e o tornando hostil à proliferação de patógenos bacterianos (FERREIRA et al., 1998).

Quanto aos micronutrientes, o leite materno mostra-se adequado ao RN em sais minerais em quantidade e proporção, evitando a sobrecarga renal de solutos. No que concerne às vitaminas, as vitaminas D e K apresentam-se em quantidades insuficientes no leite, o que pode ser revertido pela exposição ao sol ou, em alguns casos, com medicamentos e pela produção pela flora intestinal, respectivamente. A quantidade de vitaminas do leite materno pode sofrer algumas oscilações, conforme a dieta da lactante (FERREIRA et al., 1998).

A dieta da mãe poderá influenciar a composição do leite. Um exemplo disso é que a composição de ácidos graxos do leite de uma mãe reflete sua ingestão dietética, como também as concentrações de algumas vitaminas hidrossolúveis do complexo B e sais minerais. A maioria dos outros nutrientes estão presentes em níveis constantes, independente da dieta. Todavia, um estudo sugere que proteínas antimicrobianas fornecidas pelo leite materno podem ser secretadas em quantidades reduzidas se a mãe estiver desnutrida (CHANG, 1990).

O desenvolvimento do sistema imune (SI) começa *in utero* e continua após o nascimento. Constitui um processo dinâmico, envolvendo diferenciação contínua de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes se diferenciando em leucócitos da linhagem mieloide (imunidade inata) e linfoide (imunidade adquirida) (GOOD, 1995; LANDRET, 2002).

A mãe é considerada a principal fonte de microrganismos importantes para o estabelecimento da microbiota digestiva da flora do RN tanto no parto como na amamentação, através do colostro e do leite humano, que oferecem condições nutricionais favoráveis para essa implantação (NOVAK et al., 2001). As propriedades anti-infectivas do colostro e do leite manifestam-se através dos componentes solúveis, como: IgA, IgM, IgC, IgD, IgE, lisozimas, lactobacilos e outras substâncias imunorreguladoras, como também alguns componentes celulares, como os macrófagos, linfócitos, granulócitos, neutrófilos e células epiteliais (VIEIRA; SILVA; VIEIRA, 2003; TOLLARA et al., 2005). O ferro tem alta biodisponibilidade no leite materno, propiciando à criança proteção contra infecções, condições essas protetoras da anemia ferropriva, além de estar associado a menores prejuízos para o desenvolvimento cognitivo e motor da criança, conseqüentemente, para seu desempenho escolar (MONTEIRO; SZARFRAC; MONDINI, 2000).

O leite materno contém vários fatores imunomoduladores e antiinflamatórios, como a lactoferrina, anticorpos IgM, IgG e IgA, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, citocinas e fatores de crescimento. A combinação entre esses fatores é importante para o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico da criança, após o nascimento (VIEIRA; SILVA; VIEIRA, 2003; TOLLARA et al., 2005; NETO, 2006; SILVA; SCHNEIDER; STEIN, 2009). Esses compostos agem em conjunto, prevenindo desde a diarreia até a sepse, doenças crônicas não-transmissíveis e câncer (XANTHOU, 1998; GRASSI, COSTA; VAZ, 2001).

Devido à imaturidade do sistema imune no neonato, os níveis séricos das imunoglobulinas, IgM, IgA e IgG são muito reduzidos e/ou deficientes, as várias frações do sistema complemento estão em concentrações baixas no soro e o sistema imune associado às mucosas é pouco eficiente. No aspecto celular, existem inúmeras evidências da imaturidade funcional dos fagócitos e linfócitos (HANSON; WINBERG, 1985; XANTHOU, 1998; KUNZS et al., 1999; VINAGRE; DINIZ, 1999).

As imunoglobulinas do leite humano constituem a maior parte do conteúdo proteico desta secreção, alcançando mais de 90% no primeiro dia de lactação, que vai diminuindo ao longo da amamentação (XANTHOU, 1998; GRASSI; COSTA; VAZ, 2001). Existem alterações importantes nas concentrações séricas de imunoglobulinas (Igs), durante a vida intrauterina e no período neonatal. O neonato a termo produz pequena quantidade de Igs, resultante do transporte ativo placentário que se inicia por volta do terceiro mês de gestação. O feto recebe anticorpos da mãe, em especial os da classe IgG. Após o nascimento, à medida que sintetiza suas próprias Igs, a criança vai catabolizando a IgG materna (ALLANSMITH; MCCLELLAN; BUTTERWORTH, 1968; ORTIGÃO DE SAMPAIO; CASTELO BRANCO, 1997). A IgA, IgD e IgE nem atravessam a barreira transplacentária, nem são sintetizadas em quantidades significativas pelo neonato. Suas concentrações são muito baixas e aumentam lentamente no primeiro ano de vida, atingindo 10% a 25% dos níveis dos adultos (ORTIGÃO DE SAMPAIO; CASTELLO BRANCO, 1997). O termo Ig secretora descreve a classe de imunoglobulinas que são preferencialmente sintetizadas e secretadas nas mucosas externas e o exemplo é a IgA, cuja concentração no leite materno corresponde de 80% a 90% do total das Igs. A síntese de IgA sofre influência de vários fatores, tais como: a experiência imunológica da mãe, infecções maternas recentes, grau de desnutrição, controle hormonal dependente da progesterona e prolactina e os níveis de estresse ou depressão materna (VENEGAS et al., 1992). A IgA secretora presente no leite tem como principal ação a ligação a microorganismos e macromoléculas, impedindo sua aderência às superfícies das mucosas,

assim prevenindo o contato de patógenos com o epitélio, principalmente o trato gastrointestinal e respiratório do lactente (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

No que concerne às células imunes presentes no leite humano, pode-se dizer que a maior concentração é de macrófagos, seguidos de linfócitos e neutrófilos. Estas células ajudam a evitar infecções, tanto por fagocitose quanto pela secreção de substâncias imunes com algumas especificidades a microorganismos com os quais a mãe teve contato (HAMOSH, 2001). Os leucócitos estão presentes no leite em concentrações mais elevadas no colostro, com diminuição progressiva durante a lactação (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

As citocinas também estão presente no leite mateno, principalmente na sua fase aquosa. Estas substâncias imunomoduladoras são produzidas por diversas células, após estimulação, e contribuem de forma significativa nos mecanismos de defesa das mucosas do RN em aleitamento. Dentre estas citocinas destaca-se a IL-1 e IFN-d, que podem influenciar na produção da IgA secretora e outras citocinas pela glândula mamária (GAROFALO et al., 1995; GAROFALO; GOLDMAN, 1998; 1999; HAWKES; BRYAN; GIBSON, 2000).

Alguns fatores inespecíficos, como: a lactoferrina, a lisozima, o sistema complemento e o fator bífido também são encontrados no leite materno, no qual exercem as mais variadas funções (NETO, 2006), como pode ser observado no quadro a seguir.

Quadro I - A multifuncionalidade de alguns componentes anti infecciosos do leite humano.

Anti microbianos - Lactoferrina, IgA secretória, lisozima, leucocitos, macrófagos, linfócitos, oligossacáridos, fração 3 do complemento, fibronectina, mucinas.
Anti inflamatórios - Lactoferrina, IgA secretória, lisozima, acetil hidrolase, citocinas anti inflamatórias, antagonistas dos receptores das citocinas pró inflamatórias.
Anti oxidantes - Lactoferrina, α tocoferol, β caroteno, cisteína, ácido ascórbico, ácido úrico, catalase, glutatona peroxidase.
Anti proteases - Lactoferrina, α 1 antitripsina, α 1 anti quimi tripsina, inibidor da elastase, catalase, glutatona peroxidase.
Factores de crescimento - Factor de crescimento da epiderme, o factor de crescimento transformador α e β , factores de crescimento dos granulocitos, dos monocitos e dos granulocitos-monocitos.

Fonte: Neto, M.T. **Acta Pediatrica Portuguesa**, v. 1,n.37, p.23-26, 2006.

A alimentação da criança, desde o nascimento e nos primeiros anos de vida, tem repercussões ao longo de toda a vida do indivíduo; portanto, considera-se que o leite materno é um importante componente da alimentação ótima (SILVA; SCHNEIDER, STEIN, 2009). As instituições de saúde do mundo inteiro reconhecem a superioridade do leite materno sobre o leite de vaca, em relação aos aspectos nutricional, imunológico, socioeconomico e psicológico. As fórmulas industrializadas podem até suprir as necessidades dos RNs; entretanto, as propriedades protetoras do leite são únicas e não podem ser reproduzidas em laboratório (FERREIRA et al., 1998).

Álcool na lactação: como e quanto afeta a saúde do neonato?

Embora as mulheres que amamentam geralmente evitem o uso de drogas, o padrão de consumo parece não ser alterado, devido a crença, em várias populações, de que o álcool galactogênico, ou seja, que o consumo de pequenas quantidades antes do aleitamento facilita a produção de leite nas glândulas mamárias (DEL CIAMPO et al., 2009).

Em vários países esta prática é incentivada entre as lactantes, como no México, onde as mulheres são encorajadas a ingerir em torno de dois litros de pulque, uma bebida fermentada a partir da *Agave Atrovirens*, que possui um baixo teor alcoólico; na Alemanha, país em que a cerveja é considerada um "elixir mágico"; enquanto na Califórnia, onde a comunidade indochinesa prefere ervas medicinais embebidas em vinho (MENELLA, 2001).

Na China, as lactantes costumam consumir uma mistura de porco, grão de bico, lula e cabeças de camarão com vinho feito de arroz, adicionado de insetos (ICHISATO; SHIMO, 2001). Já nos Estados Unidos, em 1895, era produzida uma cerveja composta de malte de cevada e lúpulo, com baixo teor alcoólico, para ser consumida por mulheres que estavam amamentando (MENELLA, 2001). No Brasil, culturalmente também se recomenda, durante a lactação, a ingestão de cerveja escura, que não passa pelo processo de filtração e, portanto, contém mais proteínas e lúpulo (AMBEV, 2007).

Durante a lactação, a passagem de drogas do sangue para o leite materno (LM) ocorre através de mecanismos que envolvem membranas biológicas formadas por fosfolipídios e proteínas. O baixo peso molecular do álcool permite que ele atinja facilmente o LM, atravessando o capilar endotelial materno e a célula alveolar por difusão passiva. Assim, a composição da membrana exerce influência na velocidade da passagem e na concentração do álcool no leite humano (KACHANI, et al,2008).

O Comitê de Drogas da Academia Americana de Pediatria considera o consumo de álcool em doses reduzidas e esporádicas, pela mãe lactante, compatível com a amamentação; no entanto, esta mesma Academia não tem consenso em relação a uma dose máxima segura e contra-indica o uso de bebidas alcoólicas durante o aleitamento (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2001).

Em relação às alterações na saúde das mães e suas proles, quando há consumo do etanol no período de lactação, as pesquisas com animais têm demonstrado bastante variações, dependendo da fonte e concentração do etanol, do período de exposição, como também da forma de administração da droga (ZHU; SEELIG, 2000; BURGOS et al., 2004; VEIGA et al., 2007; AZARA et al., 2008; OJEDA et al., 2009).

Os prejuízos nutricionais decorrentes do consumo do álcool durante a lactação podem ser devidos ao efeito tóxico desta bebida, que passa para o RN através do leite materno. Esses efeitos podem interferir na quantidade (SUBRAMANIAN, 1995; AZARA et al., 2008) e composição química do leite (MENELLA, GUERRISHI, 1998; AZARA et al., 2008), com repercussões sobre os órgãos e sistemas responsáveis pelos processos de digestão, absorção e assimilação dos nutrientes (MELO-JÚNIOR et al., 2007). Entre os vários órgãos do trato digestório, o fígado é o mais intensamente afetado. A hepatotoxicidade do etanol está intimamente relacionada ao metabolismo do etanol, que se processa principalmente no fígado (MINCIS, 2004).

Oyama et al (2000a), examinando os efeitos da exposição de diferentes concentrações de etanol (5%, 10% e 20%) sobre o metabolismo de ratas lactantes e no ganho de peso de seus filhotes, verificaram diminuição no consumo alimentar das mães e redução de peso dos lactentes, quando expostos às maiores concentrações (10% e 20%), como também alterações no perfil lipídico (triglicerídios) e nas proteínas totais das lactantes em maiores concentrações de etanol. Esses mesmos autores, em um outro estudo com o mesmo desenho experimental, encontraram alterações no peso e conteúdo proteico do fígado dos filhotes expostos ao etanol (OYAMA et al., 2000b).

Nos alcoolistas crônicos é comum o déficit de micronutrientes, independente da redução energética usual, como também da presença de doença hepática (GLORIA et al., 1997; SARIN et al., 1997). Como consequência destas deficiências, esses indivíduos comumente apresentam anemia, esteatose hepática, estresse oxidativo e imunossupressão (PETZ, 1989; CALAMITA; BURINI, 1995).

Estudo para avaliar os efeitos nutricionais do consumo do etanol (solução hidroalcoólica de etanol a 5% e cerveja na mesma concentração), sobre ratas lactantes e suas crias, observou alterações metabólicas (diminuição dos níveis circulantes de vitamina A, elevação de proteínas plasmáticas) e nutricionais nas mães, comprometendo o desenvolvimento normal dos RNs. Além disso, o estudo constatou alterações na composição química do leite das ratas, como elevação da lactose, pela cerveja, e do potássio, pela bebida destilada, indicando que a ingestão de bebidas alcoólicas com baixo teor de etanol é capaz de provocar sérias alterações no metabolismo das mães, que são refletidas na composição do LM, que por sua vez pode comprometer a nutrição e o desenvolvimento adequado dos filhotes (BURGOS; BION; CAMPOS; WANDERLEY, 2004).

Pesquisa realizada para comparar os efeitos da ingestão (*ad libitum*) de crescentes concentrações alcoólicas semanalmente (5%, 10%, 15%, 20%), na gestação e lactação sobre a

absorção intestinal de ácido fólico de seus descendentes, teve como resultado uma redução mais significativa no peso dos descendentes expostos ao etanol durante a lactação, ao final do período experimental, quando comparados aos animais que receberam álcool durante a gestação. Também pode ser observado que, em ambas as situações (gestação e lactação), houve um prejuízo na absorção de ácido fólico intestinal (MURILLO-FUENTES; MURILLO; CARRERAS, 2003).

Outro estudo, que teve como objetivo comparar a absorção intestinal e excreção de zinco em ratos expostos ao etanol (crescentes concentrações semanais – 5%, 10%, 15% e 20%) *ad libitum*, durante a gestação e lactação (21 dias), também verificou uma redução no consumo de leite naqueles animais submetidos ao álcool na lactação, bem como diminuição no seu peso corporal. Em relação ao zinco, os autores observaram um aumento de sua absorção nos animais expostos ao etanol apenas na lactação, como também um aumento nos níveis séricos deste nutriente. No entanto, a excreção urinária de zinco foi mais elevada neste grupo (lactação) (MURILLO-FUENTES et al., 2007).

Azara et al. (2008), verificando a produção e composição (macro e micronutrientes) de leite de ratas lactantes expostas ao álcool durante 14 dias de lactação, bem como o status mineral de seus descendentes, encontraram uma redução na produção diária de leite no grupo exposto ao álcool e um aumento do conteúdo proteico e diminuição de carboidratos. Com respeito à composição de ácidos graxos, foi observado, no grupo etanol, um aumento nos de cadeia média e diminuição do DHA. Ao mesmo tempo, foi observada uma elevação de quase todos os micronutrientes no leite de ratas expostas à droga, com exceção do ferro. Quanto aos filhotes, houve uma redução no crescimento daqueles expostos ao álcool, ao final do período experimental, como também diminuição sérica de cobre e estrôncio.

O abuso do álcool está diretamente associado ao desenvolvimento também de injúrias pancreáticas. Nos alcoolistas, a incidência de pancreatite é cinquenta vezes maior do que nos indivíduos que não fazem uso do álcool (SUZANNE, 1992). Estudo em ratas lactantes que consumiram uma solução de etanol (3g/Kg peso/dia), associado a diferentes dietas (comercial e DBR), com o objetivo de avaliar as alterações histopatológicas no pâncreas de seus descendentes, observou diminuição do peso da prole dos ratos expostos ao etanol, como também dos desnutridos, no terceiro dia pos-natal. Além disto, foram encontradas também alterações significativas na vascularização pancreática (MELO-JUNIOR et al., 2007).

Há evidências de que o consumo do álcool, em humanos e também em animais de laboratório, prejudica a função imune e aumenta a incidência de infecções no hospedeiro (SZABO, 1999). Esta severidade ao sistema imune e ao estado nutricional nos alcoolistas

depende de vários fatores: idade, raça, gênero, composição corporal, fatores ambientais, duração do consumo, quantidade de álcool consumido e tipo de bebida ingerida (DIAZ et al., 2002).

Existem vários mecanismos pelos quais o álcool pode afetar a imunidade: prejudicando a habilidade das células brancas do sangue em migrar para os locais de injúria e infecção, induzindo anormalidades funcionais dos linfócitos T e B, células Natural Killer, monócitos/macrófagos, como também alterando a produção de citocinas (BAUTISTA, 2001). Entretanto, essas alterações sobre o SI estão associadas ao consumo de altas doses de álcool (COOK, 1998), enquanto o consumo de menores doses, conforme resultados de estudos clínicos e experimentais, parece aumentar a RI (MENDENHALL et al., 1997; ROMEO et al., 2007b; 2007c). Este efeito aumentado depende do tipo de bebida (se fermentada ou destilada) e da quantidade e da duração do consumo do etanol (ROMEO et al., 2007a).

No que diz respeito ao uso do álcool durante a lactação, é importante ressaltar ainda que a exposição neonatal ao álcool, via leite materno, poderá ocasionar prejuízos ao sistema imune dos RNs, levando à diminuição da resistência a infecções (LEONARD et al., 1999). O etanol via leite materno pode ainda afetar as funções intestinais e imunológicas, como redução na absorção de zinco (TAVARES et al., 1998), alterações nos tecidos linfoides intestinais (LIMA et al., 2002), timo, baço e redução de linfócitos e macrófagos (ZHU; SEELIG Jr., 2000; VEIGA et al., 2007).

Seelig-Jr., Steven e Stewart (1999), observando o efeito do consumo materno (gestação e lactação) de uma solução de etanol (6%) através de gerações (duas gerações), na resposta imune à *Trichinella Spiralis* nos neonatos até a vida adulta, encontraram uma significativa redução na proliferação dos anticorpos a este parasita, nos animais da segunda geração exposta ao etanol, como também redução no total de células T e células T citotóxicas, além de diminuição dos leucócitos totais destes animais.

Pesquisa realizada para avaliar os efeitos pré e pós-natal da ingestão de uma dieta líquida contendo etanol, Lieber-DeCarli, com concentração alcoólica de 6%, detectou uma redução no número de células tímicas aos 14 dias de lactação, como também diminuição de macrófagos no íleo dos filhotes expostos ao álcool, no 14º e 18º dia pós-natal (ZHU; SEELIG-Jr, 2000).

Estudo com ratas Wistar, ingerindo uma solução de etanol (3g/Kg/dia) por gavagem, durante a gestação e lactação, não constatou diferença na contagem diferencial de leucócitos periféricos de seus descendentes, mas identificou aumento no número de folículos totais e secundários no baço dos mesmos, bem como da área e volume destas estruturas. Neste estudo

os autores também observaram, no timo dos filhotes expostos ao etanol, uma diminuição no número médio de corpúsculos de Hassal e redução do número de Placas de Peyer e folículos linfóides intestinais destes animais (VEIGA et al., 2007).

Sabe-se que os micronutrientes são compostos orgânicos essenciais para a replicação celular, crescimento e desenvolvimento dos sistemas fisiológicos. Sua deficiência pode ocorrer devido à ingestão inadequada ou associada a doenças específicas (SILVA et al., 2007; BLACK, 2003). Em especial, os minerais cobre, zinco, magnésio e selênio têm um papel crítico na modulação da resposta imune, agindo em inúmeras atividades enzimáticas (CUNNINGHAM-RUNDIES; McNEELEY; MOON, 2005; WINTERGERST; MAGGINI; HORNIG, 2007).

O cobre desempenha um papel importante na maturação dos tecidos linfóides, atua também como cofator para a enzima superóxido dismutase (SOD) e glutatona, sintetizada no fígado, importantes na defesa antioxidante. Livre no plasma e um agente catalisador de espécies reativas de oxigênio (Eros) (BRANDT et al., 2007; THAKUR; GUPTA; KAKKAR, 2004; MACÊDO et al, 2010).

No sistema imune, pelo fato das células específicas e não-específicas apresentarem alta proliferação, o zinco tem papel fundamental no processo de multiplicação celular, além de participar, em conjunto com o cobre, da estrutura da enzima SOD (MAFRA; COZZOLINO, 2004; SENA; PEDROSA, 2005; RAYNERIO-COSTA; MARREIRO, 2006). Além disso, a carência de zinco pode ocasionar atrofia do timo e de outros tecidos linfóides, acarretando a proliferação de linfócitos e consequente linfocitopenia (LIOVERA; RODRIGUEZ, 2004; MAFRA; COZZOLINO, 2004).

O magnésio tem papel-chave na imunidade inata e adquirida e sua deficiência está relacionada a prejuízos na função imune celular (ativação de macrófagos, neutrófilos e células endoteliais), como também em maior produção de Eros (MALPUECH-BRUGÈRE et al., 2000; KABASHIMA et al., 2002; WILBORN et al, 2004; LAIRES; MONTEIRO, 2008).

O selênio tem importante papel na saúde, com ação antiinflamatória e atividade antioxidante, participando da ação de várias enzimas, sendo uma das mais estudadas a glutatona-peroxidase (RAYMAN, 2000).

Na lactação, as deficiências nutricionais da nutriz podem contribuir para a manutenção de baixas reservas de nutrientes nos lactentes, aumentando as chances de desenvolvimento de carências nutricionais nos primeiros anos de vida, período em que há maior prevalência de agravos à saúde infantil (SILVA et al., 2007).

As deficiências de micronutrientes ocorrem com frequência em alcoolistas com ou sem doença hepática, independente da redução na ingestão energética, já que o álcool causa tanto a desnutrição primária, pelo fato de deslocar os nutrientes da dieta, como a desnutrição secundária, por causar má-absorção e agressão celular, decorrentes da sua citotoxicidade direta (LIEBER, 1994; GLORIA et al., 1997; MAIO; DICHI; BURINI, 2000). Portanto, as crianças com deficiência de minerais são mais suscetíveis a desenvolver infecções frequentes e mais graves, desencadeando um ciclo vicioso de desnutrição e infecções recorrentes (SCRIMSHAW, 2003; SINGH, 2004; CUNNINGHAM-RUNDIES; McNEELEY; MOON, 2005).

É importante ressaltar, ainda, que o etanol pode deprimir a imunidade celular, devido à geração de radicais livres; entretanto, as bebidas alcoólicas que possuem substâncias antioxidantes podem exercer um efeito protetor sobre a imunidade celular (FENECH; STOCKLEY; AITKEN, 1997; PERCIVAL; SIMS, 2000). O metabolismo do álcool, seja pela via do citocromo P450, ou pela enzima álcool-dehidrogenase, tem como produto final o acetaldeído, responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio e pela peroxidação lipídica, levando a estresse oxidativo; em consequência, há uma maior utilização e depleção dos antioxidantes (BROWN et al., 2004).

Com o consumo crônico do álcool, a síntese hepática da glutathione e as enzimas envolvidas na detoxificação que usam a glutathione, glutathione-peroxidase e glutathione S-transferase são diminuídas (LIEBER, 1993). Mesmo sem cirrose (JEWELL et al., 1986), a depleção da glutathione hepática precede o aparecimento de mudanças histológicas no fígado, álcool-mediadas, o que serve de base a uma sugestão da função central da disponibilidade de glutathione na hepatotoxicidade mediada pelo álcool (LIEBER, 1993).

O consumo *ad libitum* de uma dieta líquida contendo etanol (Lieber-DeCarli), por ratas Wistar lactantes, durante 14 dias de lactação, resultou em diminuição do cobre e estrôncio plasmático em seus neonatos. No entanto, não foi detectada diferença na concentração deste mineral no fígado dos animais expostos ao álcool e seu controle. Os autores concluíram que a diminuição do cobre circulante pode ser justificada pela diminuição na síntese da proteína ceruloplasmina, já que o álcool também deprime a síntese proteica hepática (AZARA et al., 2008).

Ojeda et al. (2009), avaliando a biodisponibilidade do selênio em ratas expostas ao etanol (solução de 20% v/v), durante a gestação e lactação (21 dias), e em seus descendentes, como também a atividade da enzima glutathione peroxidase no plasma e fígado dos filhotes, verificaram que o etanol promoveu uma diminuição na ingestão alimentar das mães e

consequentemente do micronutriente estudado, o que se refletiu no peso corporal das mães e na quantidade de selênio nas fezes. Também foi detectada uma redução na concentração de selênio nas glândulas mamárias, o que afetou o balanço de nutrientes em seus descendentes. Quanto à enzima em estudo, foi observado um aumento sérico da mesma nos filhotes das mães expostas ao álcool, porém uma menor atividade da enzima em nível hepático. Os autores concluíram que o álcool diminuiu a retenção do elemento em estudo nas lactantes e em seus descendentes, afetando os depósitos de selênio nos tecidos de ambos, comprometendo o peso dos animais ao final da lactação e a ação antioxidante da glutathione peroxidase.

Diante essas considerações, fica evidente que a ingestão de álcool durante a lactação prejudica o estado nutricional das lactentes e de seus lactentes, comprometendo a absorção e o aproveitamento dos nutrientes, como também alterando a composição do leite materno, fonte de várias substâncias com ação imunológica.

3. MÉTODOS

Estrutura geral

Nenhuma outra substância é objeto tão frequente de investigação científica como o etanol, seja para o estudo do seu efeito sobre o organismo ou dos distúrbios funcionais a ele associados. Justifica-se o interesse, de um lado, pela multiplicidade de ações tóxicas sobre órgãos e tecidos, desencadeando mecanismos lesionais associados a diferentes patologias que afetam a saúde e, de outro, pela repercussão social e econômica que o seu uso abusivo acarreta (KOREN; NULMAN, 1994; MELONI; LARANJEIRAS, 2004). E, ainda, por ser a problemática do alcoolismo uma realidade atual nos diferentes segmentos populacionais, em destaque para as mulheres.

Todos os procedimentos experimentais posteriormente descritos foram realizados no Laboratório de Nutrição Experimental (LNE) do Departamento de Nutrição (DN) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), exceto o estudo histológico do timo e baço dos animais, realizado no Departamento de Patologia da UFPE e a análise bioquímica do sangue, realizada no Laboratório da Unidade de Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE.

Desde 1999, o LNE vem se empenhando em estudar as repercussões nutricionais e bioquímicas decorrentes do uso do álcool em diferentes ciclos de vida de ratos, sendo este o objetivo dos estudos do grupo engajado na linha de pesquisa intitulada: “*Nutrição e Álcool*”. As pesquisas desenvolvidas nesta linha abrangem os temas: bebidas alcoólicas durante a lactação e seus efeitos na nutrição e metabolismo: estudo em ratos; uso crônico de aguardente por ratos em envelhecimento: alterações nutricionais e bioquímicas; ingestão alcoólica com múltiplas concentrações em ratos periadolescentes de diferentes gêneros; álcool: efeitos nutricionais e metabólicos em ratos adolescentes; ingestão de bebida alcoólica e mistura alimentar do Nordeste brasileiro – efeitos em ratos de meia-idade, trabalhos estes de doutorado, mestrado e conclusão de curso, respectivamente.

O grupo de pesquisa reúne professores, nutricionistas e outros profissionais, além de alunos de doutorado e mestrado, acadêmicos de graduação (estagiários), bem como técnicos de laboratório interessados na área. O grupo visa estimular a pesquisa e o estudo do álcool, desenvolvendo projetos de pesquisas para disseminar evidências sólidas sobre os efeitos nutricionais e bioquímicos do abuso dessa substância. Os resultados dos projetos de pesquisa desenvolvidos pelo referido grupo no LNE têm sido publicados como pôsteres científicos em congressos e reuniões científicas afins, e na forma de artigos em periódicos nacionais e internacionais.

A seguir, serão apresentados os materiais utilizados na presente tese com algumas de suas características e propriedades físicas e a metodologia empregada, bem como as técnicas utilizadas durante a fase experimental, indicando os parâmetros considerados e os objetivos de cada uma delas.

Limitações da pesquisa

O trabalho aqui apresentado sofreu algumas alterações da sua versão inicial, devido a algumas dificuldades metodológicas que não foram viáveis, tendo em vista o desenho experimental (idade do animal, condições experimentais etc).

No projeto inicial pretendia-se avaliar a interferência da dieta experimental quando associada a uma bebida alcoólica, mas não tinha sido cogitado que, para tal avaliação seria necessário uma outra dieta, para comparação. Então foi incluído no estudo um grupo de dieta caseína, considerada a proteína ouro, para que fossem comparados os efeitos da dieta (seus constituintes), quando associada ao álcool.

Ressalta-se também que a ideia inicial seria avaliar, qualitativa e quantitativamente, a celularidade do lavado broncoalveolar (LBA) dos ratos recém-desmamados, como também quantificar a produção de superóxido e o índice de adesividade de macrófagos alveolares isolados do lavado broncoalveolar destes animais. No entanto, ao tentar analisar estes parâmetros, não foi possível conseguir uma quantidade suficiente de células, provavelmente pela idade dos lactentes (21 dias). Portanto, os pesquisadores buscaram outros parâmetros imunológicos que pudessem ser avaliados, levando em consideração a idade do animal.

Também se pretendia analisar a composição do leite das lactantes estudadas, já que a literatura relata que o álcool pode interferir na composição do leite materno (BURGOS et al., 2004; AZARA et al., 2008). Porém, não foi possível conseguir a quantidade de leite necessária para esta avaliação. Foram feitas várias tentativas de coletar o leite das ratas, através de coleta manual ou ainda utilizando protótipos de coletor de leite (desmamadeira) artesanal, mas o volume conseguido era bastante inferior ao necessário para a realização das análises centesimais. Embora alguns autores relatem ter conseguido avaliar a composição do leite de ratas, nas condições laboratoriais em que o presente trabalho foi desenvolvido não se dispunha de equipamentos que fizessem a leitura destes constituintes, com o volume de leite coletado, como dito anteriormente. Desta forma, todas as argumentações relacionadas a este aspecto, foram fundamentadas na literatura.

Animais

Foram utilizadas ratas gestantes da linhagem *Wistar* (*Rattus Norvegicus*, variedade *Albinus*), do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da UFPE, mantidos em condições-padrão de iluminação em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), dotado de sistema de exaustão. (MERUSSE; LAPICHICK, 1996).

O dia do nascimento foi considerado o dia 0. No dia seguinte (1º dia) foi realizada a sexagem e padronização das ninhadas, com um número de 6 filhotes / mãe (3 machos e 3 fêmeas). Os animais foram divididos em 4 (quatro) grupos de igual número (3 lactantes / grupo). O total de animais (filhotes) estudados foi de 72 (setenta e dois).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais Experimentais do Centro de Ciências Biológicas, UFPE, mediante processo número: 23076.004070/2009-03 (Anexo A).

Dietas

O estudo obedeceu a um esquema experimental, delineado em conformidade com os tipos de dietas oferecidas e a ingestão ou não da solução hidroalcoólica de aguardente (40% v/v), diluída a 15% v/v.

A dieta caseína (17%) foi equilibrada de acordo com a AIN- 93 e constituiu a dieta controle durante a lactação; já a dieta experimental foi constituída por alimentos consumidos frequentemente pela população do Nordeste brasileiro (Tabela 1):

- Feijão cariocinha (*Phaseolus vulgaris* L.);
- Arroz polido (*Oriza sativa* L.);
- Farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz);
- Frango de granja (*Gallus galináceo*).

Os alimentos constituintes da mistura alimentar, assim como as bebidas alcoólicas, foram adquiridos de uma única vez (mesmo lote), no comércio local. Posteriormente, os alimentos foram cozidos e desidratados, para transformação em farinhas que, misturadas, foram oferecidas em forma de *pellets*. A composição centesimal dos alimentos constituintes da dieta foi analisada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Leaal) do Departamento de Nutrição/UFPE, através da metodologia do Instituto Adolfo Lutz – IAL (2005). A dieta foi equilibrada de acordo com a AIN 1993, segundo as recomendações para

animais de laboratório (roedores) na lactação (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e encontra-se expressa na tabela 2.

Tabela 1- Composição das dietas oferecidas

Ingredientes	AIN-93G (g/100)*	Dieta NE- Brasil (g/100)§
Amido de milho	39,74	-
Caseína (proteína >85%)	20,00	-
Amido dextrinizado (90-94% de sacarídeos)	13,20	-
Sacarose	10,00	-
Óleo de soja	7,00	6,00
Celulose	5,00	1,55
Feijão	-	25,00
Farinha de mandioca	-	37,50
Frango	-	12,00
Arroz	-	15,00
Mix de mineral (AIN-93G)	3,5	1,70
Mix de vitaminas (AIN-93G)	1,00	1,00
L-metionina	0,30	-
Bitartarato de colina (41,1% de colina)	0,25	0,25
TBHQ, MG	0,0014	-
Total (g)	100	100

* Fonte: Reeves et al., 1993 (adaptado); § Mistura baseada na ingestão alimentar da população do Nordeste brasileiro, composta por: feijão carioca (*Phaseolus vulgaris L.*), arroz polido (*Oriza sativa L.*), farinha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*), frango de granja (*Gallus galináceo*) e óleo de soja.

Tabela 2- Composicao nutricional (100g) das dietas ofertadas as lactantes

Nutrientes	AIN-93G*	Dieta NE- Brasil
Proteínas	17,8	17,9
Carboidratos	64,4	61,0
Lipideos	7,0	7,0
Acidos graxos saturados	10,8	16,7 ^a
Acidos graxos polinsaturados	40,5	60,9 ^a
Acidos graxos monoinsaturados	16,3	24,6 ^a
Carboidratos complexos	360,1	140,5 ^b
Carboidratos simples	236,1	121,5 ^b
Kcal	3,77	3,78

* Fonte: Reeves et al., 1993 (adaptado); [§]Determinações realizadas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos - UFPE, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005). ^aTeor de ácidos graxos dos alimentos, obtidos a partir da Tabela brasileira de composição de alimentos (Taco), 2006. ^bQuantidade de carboidratos simples e complexos (Fonte: Fundação IBGE-Endef, 1996)^bObtido no comércio local.

Delineamento dos Grupos

Grupos Dieta Experimental (GDE)

GDE- Grupo Dieta Experimental Controle (N=18): lactantes ingerindo água e dieta experimental *ad libitum*;

GDEA- Grupo Dieta Experimental + Álcool (N=18): ratas mantidas, durante a lactação, com dieta experimental e água *ad libitum* e solução de aguardente (15% v/v) por gavagem.

Grupos Caseína (GC)

GC- Grupo Caseína Controle (N= 18): filhotes de ratas ingerindo água e dieta de caseína (17%) durante a lactação *ad libitum*;

GCA- Grupo Caseína + Álcool (N=18): filhotes de lactantes que receberam durante a lactação, caseína (17%), água *ad libitum* e solução de aguardente (15% v/v) por gavagem.

Ingestões hídricas e etílicas dos animais

A solução hidroalcoólica de aguardente a 15% foi administrada aos lactantes através de gavagem diária (3g de etanol/Kg/dia), no horário das 08:00 às 10:00h.

Os grupos controle (caseína e dieta experimental) receberam também, parte da água consumida diariamente, através de gavagem (mesmo volume da solução alcoólica), para que essas lactantes fossem submetidas ao mesmo estresse dos demais grupos.

Diariamente, foi realizado o controle da quantidade de água oferecida *ad libitum*.

Crescimento e desenvolvimento dos animais

O peso das lactantes foi acompanhado diariamente e dos lactentes (ninhadas), de 3 em 3 dias, até o 21º dia do nascimento. Também foi observado o aparecimento de pelos no tronco (registrado o dia de vida em que apareceram os pelos), a abertura dos olhos (número de filhotes da ninhada que abriram os olhos no 12º dia de vida), parâmetros que são considerados marcadores de desenvolvimento dos animais sob experimento.

Produção de leite

A produção láctea foi avaliada segundo Sampson e Jansen (1984), no 4º, 8º e 12º dia de lactação. Nesses dias, os filhotes foram separados de suas mães por 4 horas e ao final deste período pesados (peso inicial). Posteriormente foram colocados para mamar por 2 horas e pesados novamente (peso final). Ao final, foi aplicada a seguinte equação:

$$\text{Produção láctea (g/filhote/dia)} = 0,0332 + 0,0667 (\text{peso inicial}) + 0,877 (\text{ganho em peso})$$

Ressalta-se que o ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso final (após a mamada) e peso inicial (antes da mamada). Torna-se importante informar que para os cálculos da produção láctea, foram utilizados grupos em paralelo, com o mesmo desenho experimental, para evitar a interferência desta técnica no crescimento dos animais.

Sacrifício dos animais e coleta das amostras de sangue

Ao final do período experimental, os lactentes foram separados de suas mães para realização do jejum (12 horas), antes do sacrifício. No dia seguinte foram decapitados, para obtenção das amostras de sangue utilizadas para avaliar os parâmetros imunológicos e bioquímicos. O sangue de cada animal (filhote) foi dividido em duas partes: uma colocada em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para a realização do leucograma, e a outra colocada em tubo sem EDTA, para as análises bioquímicas e da IgA sérica. Todas as amostras foram analisadas no Laboratório da Unidade de Análises Clínicas

do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, através de kits comerciais, utilizando protocolos padrão, de acordo com as instruções dos fabricantes.

As dosagens foram realizadas de acordo com os seguintes métodos:

Dosagens Bioquímicas

Proteínas totais:

Determinadas pelo método de Gornall, Bardawill e David (1949).

Albumina

Dosadas pela metodologia de ligação com corantes, sendo utilizado o verde de bromocresol.

Globulinas:

Dosadas através da subtração dos valores individuais de proteína total e albumina sérica.

AST e ALT: Determinados pela metodologia de Reitmann Frankel (1957).

Análises Imunológicas:

Leucograma:

Para contagem total dos leucócitos foi utilizada a câmara de Neubauer. Uma alíquota da amostra foi diluída a 1:20 em solução diluidora de leucócitos (solução de Turk). Os leucócitos foram então visualizados ao microscópio de luz, utilizando-se a objetiva de 10x.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se a técnica do esfregaço sanguíneo. Para a coloração foi utilizado o kit Panótico Rápido – Laborclin Ltda. Depois de secas, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz com a objetiva de imersão de 100x e os leucócitos contabilizados através de um contador eletrônico da marca Kacil. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

IgA sérica:

A IgA foi determinada por nefelometria em automação, sistema Beckman Array 360.

Peso relativo e estudo histológico do timo e do baço

Imediatamente após a coleta do sangue (sacrifício), foi realizada uma incisão na cavidade abdominal e torácica, para a retirada dos órgãos (timo e baço), visando obter o peso relativo, calculado através do quociente entre o peso total do órgão pelo peso do animal x 100. Este artifício foi utilizado com o objetivo de verificar se o tratamento com a solução de aguardente provocou aumento ou diminuição tecidual desses órgãos. A pesagem foi feita em balança de precisão elétrica, marca Ohaus, capacidade para 2.6/oz.

Para controle da efetiva ação da solução de aguardente de cana-de-açúcar sobre os tecidos, foram obtidos segmentos transversais de maior diâmetro dos lobos dos órgãos dos lactentes dos grupos estudados. Em seguida, os cortes foram imersos em formalina, tamponada em PBS, a 10%, para fixação. Após 48 horas, o segmento tecidual foi submetido à rotina histológica: desidratação e clarificação gradativa em banhos de álcool, iniciando em 70%, progredindo até o álcool absoluto (100%). Em sequência à série de banhos, os cortes foram tratados com xilol, visando a translucidez do tecido e, finalmente, emblocados em parafina. Através de microtomia obteve-se cortes histológicos com 4µm de espessura que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), montados em lâminas, avaliados através de microscopia óptica convencional e fotografados através de sistema de microfotografia da Olympus BX41 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo Japan; 400x). A análise morfométrica foi realizada através do software para análise de imagens, ImageJ 1.37 (National Institute of Health, Bethesda, Md., USA). Foram obtidas as áreas (magnificação 100x) dos folículos linfoides do baço e das áreas medulares do timo, através de dois campos aleatórios, por lâmina de 6 animais em cada grupo.

Análises estatísticas

Na análise dos dados foram obtidas as estatísticas: média e desvio padrão (Técnicas de Estatística Descritiva) e foram utilizados os testes estatísticos: F(Anova) com dois fatores, F (Anova) com um fator, F (Anova) com medidas repetidas, teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney (Técnicas de estatística inferencial).

Para avaliar a influência dos dois fatores foi utilizado um modelo completo e, no caso de interação significativa, procedeu-se à análise comparando-se todos os pares de subgrupos formados pela combinação dos níveis (categorias) dos dois fatores.

No caso de diferenças significativas entre os grupos, as comparações entre pares de grupos foram realizadas através de Tukey quando foi comprovada diferença significativa;

através da Anova ou Least Significance Difference (LSD), no caso de incoerência entre os resultados do teste e as comparações de Tukey. No caso de diferença significativa através do teste de Kruskal-Wallis, foram utilizadas as comparações do referido teste (Conover, 231) e as comparações de Bonferroni, no caso de diferenças significativas entre os tempos de avaliação.

Para análise dos dados morfométricos dos órgãos, foram obtidas as médias e desvio padrão e utilizado o teste estatístico F (Anova), com comparações de Tamhane. A verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene.

O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%. Os dados foram digitados na planilha Excel e o software estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), na versão 15.

4. RESULTADOS

Artigos originais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as repercussões da ingestão materna de uma solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), durante a lactação, associada a uma dieta experimental sobre os parâmetros nutricionais, metabólicos e imunológicos de seus descendentes. Dois artigos científicos originais foram submetidos a revistas nacional e internacional. Doravante, serão apresentados, em ordem cronológica, os artigos em suas versões originais.

Artigo I- **“Immune response in newborn rats exposed to sugarcane alcohol associated to an experimental diet”**.

Submetido (Anexo B), como artigo original, segundo as normas (Anexo C) da revista *Alcohol*. Publicada pela Editora Elsevier, classificada como qualis internacional A2, pela Capes (ano de 2010).

PÁGINA DE TÍTULO E AUTORES

Título do trabalho: “**Resposta imune em ratos lactentes expostos a aguardente de cana-de-açúcar associada a uma dieta experimental**”.

Autores:

*LUCIANA GONÇALVES ORANGE¹

FRANCISCA MARTINS BION²

CYBELLE ROLIM LIMA¹

NICODEMOS TELES PONTES FILHO³

SIDCLEY BERNARDINO ARAUJO³

DANIELLE CASSIA DE OLIVEIRA⁴

ANA PAULA BELIZARIO ALVES⁴

MIDORI CABRAL SUGAYA⁴

CELIA MARIA MACHADO BARBOSA CASTRO⁵

¹ Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória , Núcleo de Nutrição, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco – Brasil;

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição - Laboratório de Nutrição Experimental (LNE), CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco – Brasil;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Patologia - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika), Recife, Pernambuco – Brasil;

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutricao- Curso de Graduacao em Nutrição, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco – Brasil;

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Microbiologia - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika), Recife, Pernambuco – Brasil;

Estudo conduzido no Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil.

***Autor correspondente:** Núcleo de Nutrição, UFPE, Centro Acadêmico de Vitoria, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitoria de Santo Antão- PE- Brasil. Tel.: +55 81 35233351; fax: +55 81 35234520.

E-mail address: luciana_orange@hotmail.com (L. Gonçalves de Orange)

Resposta imune em ratos lactentes expostos a aguardente de cana-de-açúcar associada a uma dieta experimental

Resumo

O presente trabalho verificou os efeitos da ingestão de uma solução de aguardente de cana de açúcar adocicada (15% v/v), associada a uma dieta experimental, por ratas lactentes, sobre alguns parâmetros imunológicos dos seus descendentes. Setenta e dois filhotes foram randomizados igualmente em quatro grupos (dezoito lactentes- nove machos e nove fêmeas/grupo): GDE (grupo dieta experimental controle); GDEA (grupo dieta experimental álcool); GC (grupo dieta caseína); GCA (grupo dieta caseína álcool). Foi verificado o peso da ninhada aos vinte e um dias, o leucograma e Iga sérica além da histomorfometria do baço e timo. As ninhadas do GCA apresentaram uma média de peso superior aos demais. Quanto a contagem das células, observou-se que houve diferença entre os grupos. Os lactentes do GC apresentaram uma média superior, em todos os parâmetros estudados, houve diferença entre os animais do GC e GCA.. O baço foi o único órgão que demonstrou interação significativa entre os grupos e gêneros e esta diferença ocorreu entre as fêmeas do GDEA e GC. As médias das áreas foliculares do baço foram mais elevadas no GDE do que no GDEA e se comprovou diferença entre esses grupos. Os achados permitem concluir que, tanto a dieta como a bebida alcoólica oferecida às lactantes neste estudo, modularam a resposta imune dos seus descendentes de forma diferenciada, dependente da composição dietética, bem como do gênero estudado. Extrapolando os resultados para os humanos, é pertinente alertar as lactantes acerca dos efeitos nocivos da ingestão de bebidas alcoólicas, principalmente a aguardente de cana-de-açúcar, como também sobre a importância de uma dieta equilibrada durante a lactação, principalmente naquelas que são alcoolistas, com o objetivo de minimizar os efeitos nocivos do etanol sobre a imunocompetência de seus filhos, proporcionando uma menor susceptibilidade a infecções na infância.

Palavras-chaves: Ratos Wistar, álcool, lactação, dieta, sistema imune

Introdução

O sistema imune é constituído de um conjunto de células, tecidos e moléculas que têm como função prevenir as infecções e erradicar aquelas estabelecidas (Abbas and Lichtman, 2007). O desenvolvimento deste sistema de defesa inicia-se no útero e continua após o nascimento. Esse processo compreende uma série de respostas celulares adaptativas a um ambiente potencialmente agressivo, tendo sua velocidade aumentada somente após o nascimento, quando a estimulação antigênica do novo ambiente se torna mais intensa (Carneiro-Sampaio, 1981; Good, 1995; Landret, 2002).

No neonato, há uma imaturidade funcional celular (fagócitos e linfócitos), além de redução dos níveis séricos das imunoglobulinas (IgM, IgA e IgG). As várias frações do sistema complemento estão em concentrações baixas no soro e o sistema imune associado às mucosas, é pouco eficiente. (Hanson and Winberg, 1985; Kunz et al., 1999; Vinagre and

Diniz, 1999; Xanthou, 1998). Devido a esta imaturidade, os recém-nascidos (RN) são mais vulneráveis às infecções, sendo fundamental a proteção conferida pelo aleitamento. O leite materno, além de fonte dos macro e micro nutrientes necessários para que o ser humano cresça e se desenvolva física, intelectual e emocionalmente, durante um dos períodos mais importantes da vida, contém vários fatores imunomoduladores e anti-inflamatórios, como a lactoferrina, anticorpos IgM, IgG e IgA, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, citocinas e fatores de crescimento. A combinação entre esses fatores é importante para o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico da criança, após o nascimento (Teresa-Neto, 2006; Silva et al., 2009; Tollara et al., 2005; Vieira et al., 2003). Esses compostos agem em conjunto, prevenindo desde a diarreia até a sepse, como também as doenças crônicas não transmissíveis até a vida adulta (Grassi, Costa; Vaz, 2001; Xanthou, 1998;).

As imunoglobulinas representam os componentes solúveis específicos do colostro e do leite maduro e estão em concentrações muito elevadas no colostro, constituindo assim a maior parte do conteúdo proteico desta secreção (Grassi et al., 2001; Kunz et al., 1999; Xanthou, 1998). A principal imunoglobulina do leite materno é a IgA, correspondendo de 80-90% do total das imunoglobulinas. A síntese de IgA sofre influência de vários fatores, tais como: a experiência imunológica da mãe, infecções maternas recentes, grau de desnutrição, controle hormonal, dependente da progesterona e da prolactina, e níveis de estresse ou depressão materna (Venegas et al., 1992). A IgA secretora presente no leite tem como principal ação a ligação a microrganismos e macromoléculas, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, assim prevenindo o contato de patógenos com o epitélio, principalmente o trato gastrintestinal e respiratório do lactente (Grassi et al., 2001).

No entanto, circunstancialmente, o leite materno pode servir como veículo para substâncias nocivas, mesmo aquelas aceitas socialmente, como é o caso do álcool e tabaco que, embora não estejam incluídas na relação das substâncias que contraídicam o aleitamento materno, podem causar prejuízos, tanto para a criança quanto para a nutriz (Del Ciampo et al., 2004; 2009).

Durante a lactação, a passagem de drogas do sangue para o leite materno (LM) ocorre através de mecanismos que envolvem membranas biológicas formadas por fosfolipídios e proteínas. O álcool, substância de baixo peso molecular, atinge facilmente o LM, atravessando o capilar endotelial materno e a célula alveolar por difusão passiva. Assim, a composição da membrana exerce influência na velocidade da passagem e na concentração do álcool no leite humano (Kachani et al., 2008).

Desta forma, é importante ressaltar que a exposição fetal ou neonatal ao álcool, via leite materno, poderá ocasionar prejuízos a vários sistemas, inclusive ao sistema imune dos recém-nascidos, levando à diminuição da resistência a infecções (Leonard et al., 1999).

Embora, nos últimos anos, tenha havido incremento nas campanhas educativas, alertando contra os malefícios do consumo do álcool, a população feminina o mantém na gestação e na amamentação (Del Ciampo et al., 2009; Parackal et al., 2007). Este tema é ainda pouco estudado, com implicações por desvendar, visando desta forma, fornecer subsídios à elucidação de aspectos ainda controvertidos. Faz-se então necessário aprofundar os conhecimentos, colaborando inclusive para a orientação das lactantes alcoolistas.

Neste contexto, nossa hipótese é que uma solução de aguardente de cana de açúcar adocicada, associada a uma dieta composta por alimentos representativos da Região Nordeste do Brasil, quando ingeridas por ratas lactantes, podem afetar negativamente alguns parâmetros imunológicos dos seus descendentes.

Materiais e métodos

Animais e dietas

Foram utilizadas ratas gestantes da linhagem *Wistar* (*Rattus Norvegicus*, variedade *Albinus*), do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da UFPE, mantidos em condições-padrão de iluminação (Merusse and Lapichick, 1996).

O dia do nascimento foi considerado o dia 0. No dia seguinte (1º dia) foi realizada a sexagem e padronização das ninhadas, com um número de 6 filhotes / mãe (3 machos e 3 fêmeas). Os animais foram divididos em 4 (quatro) grupos de igual número (3 lactantes / grupo). O total de animais (filhotes) estudados foi de 72 (setenta e dois).

O estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética de Animais Experimentais do Centro de Ciências Biológicas, UFPE, sob o processo nº 23076.004070/2009-03.

Dietas

O estudo obedeceu a um esquema experimental, delineado em conformidade com os tipos de dietas oferecidas e a presença ou não de ingestão da solução hidroalcoólica de aguardente (40% v/v), diluída a 15%.

A dieta caseína (17%), equilibrada de acordo com a AIN- 93 (Reeves et al., 1993), que representou a dieta controle durante a lactação, e a dieta experimental constituída de alimentos consumidos frequentemente pela população do Nordeste brasileiro:

- Feijão cariocinha (*Phaseolus vulgaris* L.);
- Arroz polido (*Oriza sativa* L.);
- Farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz);
- Frango de granja (*Gallus galináceo*).

Os alimentos constituintes da dieta experimental, assim como as bebidas alcoólicas, foram adquiridos de uma única vez (mesmo lote), no comércio local. Posteriormente, foram cozidos, desidratados e transformados em farinhas, que foram misturadas e oferecidas em forma de *pellets*. A composição centesimal dos alimentos utilizados na dieta foi determinada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Leaal) do Departamento de Nutrição/UFPE, utilizando a metodologia do Instituto Adolfo Lutz – IAL (2005), equilibrada de acordo com a AIN 1993, segundo as recomendações para animais de laboratório (roedores) na lactação (Reeves et al., 1993) e encontra-se expressa na tabela 1.

Delineamento dos Grupos

Grupos Dieta Experimental (GDE)

GDE- Grupo dieta experimental controle (N=18): lactantes ingerindo água e dieta experimental *ad libitum*;

GDEA- Grupo dieta experimental + álcool (N=18): ratas mantidas, durante a lactação, com dieta experimental e água *ad libitum* e solução de aguardente (15% v/v) por gavagem.

Grupos Caseína (GC)

GC- Grupo Caseína Controle (N= 18): filhotes de ratas ingerindo água e dieta de caseína (17%) durante a lactação *ad libitum*;

GCA- Grupo caseína + álcool (N=18): filhotes de lactantes que receberam durante a lactação, caseína (17%), água *ad libitum* e solução de aguardente (15% v/v) por gavagem.

Sacrifício dos animais e análises imunológicas

Ao final do período experimental, os lactentes foram separados de suas mães, para jejum (12 horas), antes do sacrifício. No dia seguinte foram decapitados, para obtenção das amostras de sangue utilizadas na avaliação dos parâmetros imunológicos. O sangue de cada animal

(filhote) foi colocado, parte em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para a realização do leucograma, e a outra parte em tubo sem EDTA, para a análise da IgA sérica. As análises foram realizadas no Laboratório da Unidade de Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, utilizando de kits comerciais e seguindo um protocolo padrão, de acordo com as instruções dos fabricantes.

As dosagens foram realizadas adotando os seguintes métodos:

Leucograma:

Contagem de leucócitos:

Para contagem total dos leucócitos foi utilizada a câmara de Neubauer. Uma alíquota da amostra foi diluída a 1:20 em solução diluidora de leucócitos (solução de Turk). Os leucócitos foram então visualizados ao microscópio de luz, utilizando-se a objetiva de 10x.

A contagem diferencial de leucócitos foi feita pela técnica do esfregado sanguíneo. Para a coloração foi utilizado o kit Panótico Rápido – Laborclin Ltda. Depois de secas, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz com a objetiva de imersão de 100x e contabilizadas por um contador eletrônico da marca Kacil. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

IgA sérica:

A IgA foi determinada por nefelometria em automação, sistema Beckman Array 360.

Peso relativo e estudo histológico do timo e do baço

Imediatamente após a coleta do sangue, foi realizada uma incisão na cavidade abdominal e torácica, para a retirada dos órgãos (timo e baço), visando a obtenção do peso relativo, calculado pelo quociente entre o peso total do órgão e o peso do animal x 100. Este artifício foi utilizado com o objetivo de verificar se o tratamento com a solução de aguardente provocou aumento ou diminuição tecidual desses órgãos. A pesagem foi feita em balança de precisão elétrica, marca Ohaus, capacidade para 2.6/oz.

Posteriormente à pesagem dos órgãos, obteve-se segmentos transversais de maior diâmetro dos lobos dos órgãos dos lactentes. Em seguida, os cortes foram imersos em formalina, tamponada em PBS, a 10%, para fixação. Após 48 horas, o segmento tecidual foi submetido à rotina histológica: desidratação e clarificação gradativa em banhos de álcool, iniciando em 70%, progredindo até o álcool absoluto (100%). Em sequência à série de banhos, os cortes foram tratados com xilol, visando a translucidez do tecido e finalmente

emblocados em parafina. Através de microtomia foram obtidos cortes histológicos com 4µm de espessura, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE), montados em lâminas e avaliados através de microscopia óptica convencional e fotografados utilizando o sistema de microfotografia da Olympus BX41 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan; 400x). A análise morfométrica foi realizada através do software para análise de imagens, ImageJ 1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA). Foram obtidas as áreas (magnificação 100x), dos folículos linfoides do baço e as medulares do timo, expressas em pixels, através de dois campos aleatórios por lâmina de 6 animais, em cada grupo.

Análises estatísticas

Na análise dos dados foram obtidas as médias e o desvio padrão e utilizados os testes estatísticos: F (Anova), com um e dois fatores e médias repetidas. No caso de diferenças entre os grupos, as comparações foram realizadas pelo teste de Tukey e, no caso de incoerência entre os resultados, utilizou-se o Least Significance Difference (LSD). Na ocorrência de diferença através do teste de Kruskal-Wallis, foram utilizadas as comparações do referido teste (Conover, 231) e as comparações de Bonferroni, quando houve diferenças entre os tempos de avaliação.

Para análise dos dados morfométricos dos órgãos foi utilizado o teste estatístico F (Anova), com comparações de Tamhane. A verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene.

O nível de significância utilizado foi de 5,0% e o “software” para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), na versão 15.

Resultados

A Figura 1 apresenta o peso das ninhadas aos 21 dias de experimento. Destaca-se que houve diferenças entre os pares de grupos ($p = 0,001$), com exceção dos grupos GDE e GDEA e as médias mais elevadas foram registradas em GCA ($270,07 \pm 6,88$) e GC ($250,57g \pm 6,87$).

No que concerne a contagem das células analisadas (Tabela 2), observa-se que houve diferença entre os grupos, nos leucócitos totais ($p=0,002$) e suas subpopulações. Os lactentes do GC apresentaram uma média superior, em todos os parâmetros estudados, quando comparados aos demais grupos; entretanto, essa diferença só foi significativa entre os animais do GC e GCA.

A IgA sérica não apresentou diferença em nenhuma das interações.

Na avaliação do peso relativo dos órgãos, o baço foi o único que demonstrou interação significativa entre os grupos e gêneros ($p=0,025$) e esta diferença ocorreu entre as fêmeas do GDEA ($0,37 \pm 0,09$), as quais apresentaram uma média de peso superior àquela do GC ($0,23 \pm 0,09$) (Figura 2B). O timo não apresentou diferença em nenhuma das comparações, como pode ser verificado na Figura 2.

A tabela 3 apresenta as médias e desvio-padrão das áreas foliculares do baço e medulares do timo dos grupos estudados. Verifica-se que as médias das áreas foliculares do baço foram mais elevadas no GDE do que no GDEA (Figura 3) e se comprovou diferença entre esses grupos ($p=0,035$), através dos testes de comparações pareadas.

Discussão

O consumo de álcool de forma aguda ou crônica resulta em defeitos na imunidade inata e adaptativa (Nelson, 2002; Szabo, 1999). Estas mudanças estão associadas com o aumento do risco de infecções e alguns tipos de câncer (MacGregor, 1986).

Há algumas décadas tem havido maior entendimento da relação entre imunocompetência e nutrição. Deficiências de micronutrientes específicos, concomitante com desnutrição proteico-energética, alteram a resposta imune. Isto tem sido relatado em crianças e em modelos experimentais (Ojeda et al., 2009; Vidueiros et al., 2008).

Na presente pesquisa, apesar da ninhada do GCA ter apresentado um maior peso em relação aos demais grupos, pode ser verificado prejuízo no que diz respeito à contagem de leucócitos e de linfócitos, nestes animais. Muitos estudos em humanos e animais têm demonstrado que a ingestão de etanol pode contribuir para o ganho de peso, principalmente quando esta ingestão ocorre de forma aguda (Aguiar et al., 2004; 2007; Kachani et al., 2008;). No entanto, é importante reforçar que as calorias advindas do etanol são calorias vazias, pobres, principalmente em micronutrientes (Aguiar et al., 2004; 2007).

Estudo realizado para comparar se o consumo de etanol P.A. (6% v/v) ou na forma de vinho (diluído a 6% v/v) associado à dieta caseína, durante oito semanas, poderia suprimir a resposta imunológica em ratos adultos que receberam injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeos (LPS) ao final do período experimental, constatou que os animais expostos ao etanol tiveram diminuição percentual das células imunes avaliadas (leucócitos e linfócitos), resultados estes diferentes dos que ingeriram vinho. Quanto à ingestão alimentar e de líquidos, como também em relação ao peso, os animais não diferiram entre os grupos. Os autores justificaram que a diferença encontrada deve ser atribuída à composição do vinho, o qual

contém substâncias antioxidantes, como os componentes fenólicos, que permitiram uma melhor detoxificação dos compostos derivados do metabolismo do etanol (Percival and Sims, 1999). Resultados similares foram verificados em outra pesquisa que teve como objetivo avaliar a repercussão imunológica, sobre seus descendentes, de uma ingestão pré e pós-natal de etanol (3g/Kg/dia), associada à dieta comercial (Labina) até o final da lactação (25 dias), através da contagem diferencial dos leucócitos periféricos e da histomorfometria de alguns órgãos imunes destes animais. Contudo, não foram detectadas alterações no número de células periféricas destes animais, em relação aos do grupo controle. No entanto, estes achados podem ser justificados pelo período de abstinência que os animais passaram (15 dias) para que as referidas análises fossem realizadas. Quanto ao peso dos filhotes, não foi observada diferença entre os grupos, desde o nascimento até o final do período experimental (Veiga et al., 2007).

Já é sabido que a caseína constitui uma fonte proteica de alto valor biológico (Sgarbieri, 1982). Entretanto, trabalho para comparar a digestibilidade da caseína com outras fontes proteicas de origem animal (carne bovina e de rã) não constatou diferença entre essas fontes proteicas (Pires et al., 2006). Uma outra pesquisa, que teve como objetivo comparar as respostas imunológicas em ratos expostos a uma dieta à base de caseína e a proteínas do soro do leite, verificou que os animais do grupo caseína tiveram uma resposta imunológica deficiente em relação ao outro grupo (Pacheco et al., 2005).

Os resultados da atual pesquisa parecem ter sofrido interferência da composição da dieta, seja da fonte proteica utilizada ou ainda da distribuição calórica dos nutrientes da dieta e suas fontes. Os autores do presente trabalho acreditam que os resultados constatados podem divergir de alguns encontrados na literatura, o que pode ser justificado por algumas alegações: 1º) o objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da associação de uma dieta experimental com uma bebida específica, ambas consumidas com frequência no Nordeste brasileiro. Por isso, foi necessário utilizar a caseína como dieta controle, acreditando-se nas suas propriedades nutricionais. Os trabalhos encontrados na literatura que fizeram uso da caseína, em sua quase totalidade objetivaram observar a ação do álcool (ou bebida alcoólica) *per se* e não avaliar sua ação quando associado a dietas com composição de alimentos e nutrientes diferentes. 2º) Ao mesmo tempo, é sabido que o álcool altera o pH do lúmen intestinal, principalmente quando há consumo de bebidas com teor moderado de etanol (10 a 20%) ou ainda aquelas fermentadas (vinho e cerveja) (Bode and Bode, 1997), alterando a digestibilidade das proteínas, já que as enzimas responsáveis pela hidrólise das mesmas necessitam de um pH alcalino (Krause, 2010). Além disso, o álcool altera a integridade e a

permeabilidade da mucosa intestinal, prejudicando assim a digestão e a absorção de muitos macro e micronutrientes (Bode and Bode, 1997). Vale ressaltar que a bebida utilizada nessa pesquisa, apesar de ter um alto teor alcoólico (40%), foi diluída a 15% v/v no experimento. Além disso, é uma bebida que, durante a sua fabricação, passa por fermentação e posterior destilação. Desta forma, tanto a digestibilidade como a biodisponibilidade das proteínas (mais pronunciadas na dieta caseína) e de outros nutrientes que compunham as dietas oferecidas às ratas lactantes, podem ter sido diminuídas, refletindo na composição do leite das mesmas. Vários estudos em ratos já demonstram que, quando o etanol é ingerido durante a lactação, o teor de alguns macro e micronutrientes é reduzido no leite materno, e este, sendo a fonte alimentar dos lactentes, tem a sua função imunológica prejudicada (Azara et al., 2008; Burgos et al., 2004; Ojeda et al., 2009). Vale ressaltar que alguns micronutrientes importantes para a imunocompetência estão associados, no leite, às proteínas do mesmo, oferecendo estabilidade a essas estruturas e, ao que parece, esta associação acontece em pH alcalino ($\text{pH} \cong 6,6$) (Gaucheron, 2005).

Alguns micronutrientes, como o zinco, magnésio, selênio e cobre, são importantes elementos envolvidos na síntese de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutatona, glutatona peroxidase (Cunningham-Rundies et al., 2005; Macêdo et al., 2010; Wintergerst et al., 2007). Com o consumo crônico do álcool, diminui a síntese hepática da glutatona e de outras enzimas envolvidas na detoxificação da droga (Lieber, 1993). O etanol pode deprimir a imunidade celular, devido à geração de radicais livres. O metabolismo do álcool, seja pela via do citocromo P450, ou pela enzima álcool-dehidrogenase, tem como produto final o acetaldeído, responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio e pela peroxidação lipídica, levando ao estresse oxidativo; em consequência, há uma maior utilização e depleção dos antioxidantes (Brown et al., 2004).

Ojeda et al.(2009), avaliando a disponibilidade do selênio e a atividade da enzima glutatona peroxidase, importantes na desintoxicação dos metabólitos do álcool, no plasma e fígado de filhotes e em ratas expostas ao etanol (solução de 20% v/v), associados à dieta caseína (AIN-93), durante a gestação e lactação, verificaram uma diminuição dos parâmetros avaliados, concluindo que o etanol prejudicou a biodisponibilidade do selênio nas lactantes, especialmente sobre as glândulas mamárias, afetando o balanço deste nutriente em seus descendentes. No que concerne ao ganho de peso materno, as lactantes expostas ao etanol apresentaram redução em relação aos demais grupos (*pair-feed* e controle). Porém, na análise do peso ao nascer não foi verificada diferença entre os animais dos diversos grupos, o que

não ocorreu ao final da lactação, em que os animais dos grupos *pair-feed* e álcool tiveram seus pesos diminuídos, sendo exacerbado este efeito no grupo etanol.

A terceira e última possível explicação para os resultados aqui encontrados tem a ver com as diferenças na composição da dieta oferecida aos animais, quanto aos constituintes, já que em relação ao valor calórico total elas são isoenergéticas.

O fígado é o órgão responsável pela detoxificação de várias drogas, inclusive o álcool. No entanto é nele também que se processam todo o metabolismo dos nutrientes ingeridos, bem como a síntese de várias substâncias como proteínas, com várias ações fisiológicas. O alcoolismo pode acarretar muitas consequências para este órgão, conhecida como doença hepática alcoólica (DHA), como exemplo: esteatose, hepatite alcoólica e cirrose (Matos, 2006; Mincis, 2004). Por outro lado, alguns estudos vêm demonstrando que a acumulação de lipídeos hepáticos sofre também influência do excesso de peso na infância e também na vida adulta, associado ou não ao consumo de bebidas alcoólicas (Ângulo, 2002; Dias et al., 2009; Hamer et al., 2006, Soder and Baldisseroto, 2009;). Há vários anos já foi demonstrado que, quando há uma maior contribuição calórica advinda de carboidratos (principalmente os simples, como glicose, frutose e sacarose) e lipídeos (especialmente ácidos graxos saturados e poli-insaturados) na dieta, associada à ingestão de etanol, ocorre uma maior deposição de lipídeos hepáticos (Chen et al., 1977).

Ao analisar a composição das dietas aqui oferecidas (Tabela 1), observa-se que as mesmas são isoenergéticas; porém, na análise das fontes dos nutrientes, percebe-se que a caseína é mais rica em açúcares simples do que aqueles da dieta experimental. Entretanto, em relação à fonte lipídica a dieta experimental apresentou-se mais rica em ácidos graxos saturados. Portanto, essas diferenças na qualidade advinda destes constituintes, associada à ingestão de uma bebida alcoólica rica também em açúcares (Brasil, 2003; 2005), além de outras possíveis substâncias hepatotóxicas como: furfural, metanol, carbamato de etila, e acroleína, contidas na aguardente (Zacaroni et al., 2010), pode ter também proporcionado a injúria hepática naqueles animais expostos ao álcool, o que foi detectado através de alguns dados bioquímicos (dados não mostrados), porém exacerbado no grupo da dieta caseína devido aos outros fatores já citados.

Quanto à histomorfometria dos órgãos imunes analisados, foram verificadas alterações importantes, principalmente no baço dos lactentes. Neste órgão, as respostas imunes inata e adaptativa podem ser eficientes, tornando-o importante para a homeostase imunológica, em que a polpa branca é responsável pela imunidade adaptativa e a zona marginal está envolvida

com ambas as respostas, através de uma específica população de macrófagos e células B (Mebius and Kraal, 2005).

A hiperplasia do baço, derivada da ação do etanol, verificada neste estudo, parece ter sido mais evidente nos animais do sexo feminino do GDEA, porém com uma redução na área de seus folículos linfoides. Similarmente, Melo-Júnior et al. (2001) observando as alterações esplênicas nos filhotes de ratas expostas ao etanol na gestação e lactação, também verificaram aumento no baço dos animais do grupo álcool, embora este dado não tenha apresentado diferença quando comparado ao grupo controle. Em outro estudo com o mesmo desenho experimental, porém utilizando método histomorfométrico diferente, com o objetivo de analisar as alterações decorrentes da ingestão de etanol sobre a imuno-arquitetura de alguns órgãos importantes para a resposta imune (timo, baço e placas de Peyer,s) de seus descendentes, os autores encontraram um aumento significativo no número total, bem como na área e volume dos folículos linfoides esplênicos; entretanto, o timo não teve redução do número médio de corpúsculos de Hassal, porém apresentou um padrão mais intenso de infiltrações de adipócitos entre os lóbulos tímicos e uma maior deposição de colágeno intersticial no grupo etanol, quando comparado ao grupo controle (Veiga et al., 2007).

Tem sido demonstrado, em estudos epidemiológicos e experimentais, que as mulheres são mais suscetíveis às doenças induzidas pelo álcool (Brito et al., 2005; Gallucci et al., 2004; Sato et al., 2001), que incluem principalmente as patologias do fígado, cérebro e cardiovasculares. Essas diferenças podem ser explicadas devido à farmacocinética do álcool neste sexo, além das interferências hormonais envolvidas (Kachani et al., 2008; Sato et al., 2001).

O baço é considerado a maior unidade do sistema mononuclear fagocitário. Sendo assim, está envolvido em todas as inflamações sistêmicas, quando geralmente aumenta de tamanho, sendo neste caso denominado baço ativado ou estado reacional hiperplásico. Este tipo de esplenomegalia é causado pelas modificações dos cordões de Billroth, constituídos pelo tecido linfoide e os seios ocupados pelos elementos do sangue circulante (Franco et al., 1994; Pereira et al., 1999). Por outro lado, o etanol e seu metabolito acetaldeído parecem causar disfunção das *tight junctions* do epitélio das vilosidades intestinais, permitindo a passagem de macromoléculas como lipopolisacarídeos de bactérias *gram* negativas que colonizam o intestino. Estas, por sua vez, atingem o fígado, pela circulação portal, e ativam uma série de mecanismos imunes. As células de Kupffer são estimuladas por ligação direta ao CD14 e é desencadeada uma resposta imune local com produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina 1, prostaglandinas E₂ e D, leucotrienos, como recrutamento de

polimorfonucleares, aumento da expressão de moléculas de adesão, do estresse oxidativo e consumo de O₂, da expressão HLA, estimulação de fibroblastos e células de Ito e da deposição de colágeno. Essas reações em cadeia favorecem o desenvolvimento da doença hepática alcoólica, embora apenas um pequeno percentual de alcoolistas tendam a desenvolvê-la (Matos, 2006; Rao et al., 2004).

Desta forma, os achados histológicos do baço verificados no presente estudo podem ter sido causados pela inflamação sistêmica derivada da ação do álcool *per se*, que provavelmente foi mais exacerbada nas fêmeas do GDEA, devido a uma maior susceptibilidade a injúrias decorrentes do uso do álcool neste gênero, como também da constituição da dieta oferecida a este grupo. Conforme já citado anteriormente, esta dieta tem maior conteúdo de ácidos graxos saturados do que a dieta caseína, o que pode ter favorecido há uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (Diniz et al., 2004). Vale ressaltar ainda que, embora o baço tenha apresentado um aumento de peso, as áreas dos seus folículos linfóides foram reduzidas em relação aos demais grupos, evidenciando uma redução da maturação linfocitária destes animais (Mebius and Kraal, 2005), o que pode ser comprovado pela linfocitopenia periférica neste grupo, embora não tenha sido verificada diferença desta variável em relação ao seu grupo controle.

No que diz respeito ao timo, embora não tenha sido comprovada a atrofia tímica, comumente encontrada na literatura (Wang and Spitzer, 1997), foi observada uma diminuição de seu peso absoluto (dados não mostrados) no GDEA, em relação aos demais grupos. As argumentações para esses achados baseiam-se num menor peso corporal dos lactentes deste grupo, como também um maior desvio padrão no mesmo, demonstrando uma heterogenicidade desta amostra durante o período experimental. Outra possível explicação para as diferenças de peso do timo encontradas no presente trabalho em relação a outros dados da literatura, seria o tipo de exposição utilizada, já que, na maioria das pesquisas que avaliaram o peso e a atividade tímica os animais foram expostos ao etanol na gestação e lactação, o que pode ter exacerbado a ação tóxica do álcool sobre este órgão.

Diante destes achados, constata-se que, tanto a dieta como a bebida alcoólica oferecida às lactantes, neste estudo, modularam vários aspectos da resposta imune dos seus descendentes de forma diferenciada, dependente da composição dietética, bem como do gênero estudado. Extrapolando os nossos resultados para os humanos, é pertinente alertar as lactantes acerca dos efeitos nocivos da ingestão de bebidas alcoólicas neste ciclo de vida, principalmente a aguardente de cana-de-açúcar, como também sobre a importância de uma dieta equilibrada durante a lactação, principalmente naquelas que são alcoolistas, com o

objetivo de minimizar os efeitos nocivos do etanol sobre a imunocompetência de seus filhos, proporcionando desta forma uma menor susceptibilidade a infecções na infância.

Referências

Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. (2007). *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. (Rio de Janeiro: Elsevier).

Aguiar, A.S., Da-Silva, V.A., and Boaventura, G.T. (2004). Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? *Braz J Med and Biol Res* 37, 841-846.

Aguiar, A.S., Da Silva, V.A., and Boaventura, G.T. (2007) As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo? *Nutr Pauta* 45-49.

Ângulo, P.(2002). Nonalcoholic faty liver disease. *N Engl J Med.*, 346, 1221-1231.

Azara, C.R.P., Maia, I.C., Rangel, C.N., Silva-Neto, M.A.C., Serpa, R.F.B., De Jesus, E.F.O., Tavares do Carmo, M.G., and Fialho, E.. (2008). Ethanol intake during lactation alters milk nutrients composition and growth and mineral status of rat pups. *Biol Res* 41, 317-330.

Bode, C., and Bode, J.C. (1997). Alcohol,s role in gastrointestinal tract disorders. *Alcohol Health Res World* 21, 76-83.

Brito, A.S.C., Melo-júnior, M.R., Araújo-Filho, J.L.S., Patu, V.J.R.M., and Pontes-Filho, N.T. (2005). Exposição de ratas adultas a doses crônicas de aguardente: estudo ponderal e histomorfológico do coração. *An Méd UFPE* 50, 100-103.

Brown, L.A.S., Harris, F.L., Ping, X.D., and Gauthier, T.W. Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? *Alcohol* 33, 191-197.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; decreto n^o 4851 de 02/11/2003, *Diário Oficial da União*, Brasília, 03/10/2003.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução normativa n^o 13 de 29/6/2005, *Diário Oficial da União*, Brasília, 30/06/2005.

- Burgos, M. G. P. A., Bion, F. M., Campos, F. A. C. E. S., and Wanderley, L. G. (2004). Efeitos de bebidas alcoólicas no metabolismo e nutrição de ratos lactentes e recém-nascidos. *An Fac Med UFPE* 49, 50-55.
- Carneiro-Sampaio, M.M.S. (1981). Desenvolvimento do sistema imunitário do ser humano. *Rev Pediatr* 3, 197-207.
- Chen, N.S.C., Chen, N.C., Johson, R.J., McGinnis, J., and Dyer, I.A. (1977). Effect of dietary composition on hepatic lipid accumulation of rats with chronic ethanol intake. *J Nutr* 107, 1114-1119.
- Cunningham-Rundles, S., McNeeley, D.F., and Moon, A. (2005). Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Aller Clin Immunol* 115, 1119-1128.
- Del Ciampo, L.A., Ricco, R.G., and Almeida, C.A. (2004). Aleitamento materno: passagens e transferências mãe-filho. (São Paulo: Atheneu).
- Del Ciampo, L.A., Ricco, R.G., Ferraz, I.S., Daneluzzi, J.C., and Martinelli-Junior, C.E. (2009). Prevalência de tabagismo e consumo de bebida alcoólica em mães de lactentes menores de seis meses de idade. *Rev Paul Pediatr* 27, 361-365.
- Dias, G.A., Araujo, J.O., Ferreira, D.M., Melo, F.F.S., Sampaio, P.R., Bastos, P.R.S., Ramalho, S.R., Valério, H.M.G., and Bragagnolo-Júnior, M.A. (2009). Avaliação da frequência de esteatose hepática detectada ao ultrassom abdominal de pacientes obesos não alcoolistas. *Rev Fac Med FAME/Unicap* 28, 115-120.
- Diniz, Y.S., Cicogna, A.C., Padovani, C.R., Santana, L.S., Faine, L.A., Novelli, E.L. (2004). Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition* 20, 230-234.
- Franco, M., Schmitt, F.C., Bacchi, M.M., Marigo, C., Paes, R.P. (1994). Sistema hemolinfopoiético. *In Bogliolo Patologia*. 5ª Ed. G, Brasileiro Filho, J.E.H. Pittella, F.E.L. Pereira, E.A. Bambirra, A.J.A. Barbosa, eds. (Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan), pp.665-722.

- Fundação IBGE-Endef. (1996). Tabela conteúdo de carboidratos totais de alguns alimentos. 4 ed. Rio de Janeiro PP.24-27.
- Gallucci, R.M., Sloan, D.K., O'dell, S.J., and Reinke, L.A. (2004). Differential expression of liver interleukin-6 receptor-alpha in female versus male ethanol-consuming rats. *Alcoh Clin Exper Res* 28, 365-373.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reprod Nutr Dev*, 45, 473-483.
- Good, R. A. (1995). Organization and development of the immune system. Relation to its reconstruction. *An New York Acad Sci* 770, 8-33.
- Grassi, M.S., Costa, M.T.Z., and Vaz, F.A.C. (2001). Fatores imunológicos do leite humano. *Rev Pediat* 23, 258-263.
- Hamer, O.W., Aguirre, D.A., and Casola, G (outros autores). (2006). Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. *Radiographics* 26, 1637-1653.
- Hanson, L.A., and Winberg, J. (1985). Breastfeeding as a protection against gastroenteritis and other infections. *Acta Paediat Scand* 74, 641-642.
- Instituto Adolf Lutz. (2005). Normas analíticas. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ªed. (São Paulo).
- Kachani, A.T., Brasiliano, S., and Hochgraf, P.B. (2008). O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Rev Psiq Clin* 35, 21-24.
- Kachani, A.T., Okuda, L.S., Barbosa, A.L.R., Brasiliano, S., and Hochgraf, P.B. (2008). Aleitamento Materno: quanto o álcool pode influenciar na saúde do bebê? *Rev Pediat* 30, 249-256.
- Kunzs, C., Palmero, M.R.; Koletzko, B.; and Jensen, R. (1999). Nutritional and biochemical properties of human milk. Part II: Lipids, micronutrients and bioactive factors. *Clin Perinatol* 26, 335-359.
- Landret, K. S. (2002). Critical windows in development of the rodent immune system. *Human Exper Toxicol* 21, 493-498.

- Lieber, C.S. (1993). Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 13, 136-153.
- Macedo, E.M., Amorim, M.A.F., Da Silva, A.C.S., and Castro, C.M.M.B. (2010). Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune das crianças com desnutrição grave. *Rev Paul Pediatr* 28, 329-336.
- MacGregor R.R. (1986). Alcohol and immune defence. *JAMA* 256, 1474-1479.
- Mahan, L.K., and Escott-Stump, S. (2005). **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, 11ª ed. São Paulo: Rocca, 2005. p. 203.
- Matos, L.C. (2006). Doença hepática alcoólica. *Rev Soc Portug Med Int* 13, 207-216.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature*, 5, 606-616.
- Melo-Júnior, M.R., Lima, L.A., Cavalcante, C.L.B., and Pontes-Filho, N.T. (2001). Alterações esplênicas na exposição pré e pós-natal ao álcool: um estudo histomorfométrico. *An Facul Med UFPE* 46, 8-13.
- Merusse, J. L. B., and Lapichick, V.B.V. (1996). Instalações e equipamentos. In: *Manual para técnicos em bioterismo*. 2. ed. (São Paulo:EPM) pp. 15-25.
- Mincis, M.(2004). Doença hepática alcoólica: diagnóstico e tratamento. *Diagn. Trat* 9, 52-60.
- Ojeda, M.L., Vazquez, B., Nogales, F., Murillo, M.L., and Carreras, O. (2009). Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Intern J Envirom Res Public Health* 6, 2139-2149.
- Pacheco, M.T. B., Dias, N.F.G., Baldini, V.L.S., Tanikawa, C., and Sgarbieri, V.C. (2005). Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro do leite. *Cien e Tecnol Alim* 25, 333-338.
- Parackal, S., Ferguson, E., and Harraway J. (2007). Alcohol and tobacco consumption among 6-24 months post-partum New Zealand women. *Matern Child Nutr* 3, 40-51.
- Percival, S.S., and Sims, C.A. (2000). Wine modifies the effects of alcohol on immune cells of mice. *J Nutr* 130, 1091-1094.

Pereira, S.A.L., Corrêa, B.S., Minicucci, G.P., Aires, L. G. M., Castro, E.C.C., Reis, M. A., and Teixeira, V.P.A. (1999). O peso do baço em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 167-170.

Pires, C.V., Oliveira, M.G.A., Rosa, J.C., and Costa, M.N.B. (2006). Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. *Ciênc Tecnol Aliment* 26, 179-187.

Rao, R.K., Seth, A., and Sheth, P. (2004). Recent advances in alcoholic liver disease: role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, 881-884.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. (1993). AIN-1993. Purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76^A rodent diet. *J Nutri* 123, 1939-1951.

Sato, N., Lindros, K.O.; Baraona, E., Ikejima, K., Mezey, E. Jarvelainen, H., and Ramchandani, V.A. (2001). Sex difference in alcohol-related organ injury. *Alcoh Clin Exper Res* 25, 40S-45S.

Seelig- Jr., L.L., Steven, W.M., and Stewart, G.L. (1999). Second generation effects of maternal ethanol consumption on imunity to trichinella spiralis in female rats. *Alcoh Alcohol* 34, 520-528.

Sgarbieri, V. C., and Whitaker, J. R. (1982). Physical, chemical and nutritional properties of common beans (*Phaseolus*) proteins. *Adv Food Res* 28, 93-166.

Silva, D.R.N., Schneider, A.P., and Stein, R.T. (2009). O papel do aleitamento materno no desenvolvimento de alergias respiratórias. *Scien Med* 19, 35-42.

Soder, R.B., Baldisseroto, M. (2009). Esteatose hepática na obesidade infantil: investigação por imagem. *Scientia Medica*, 19, 202-208.

Szabo G. (1999). Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 3, 830-841.

Tabela Brasileira de composição de alimento (2006) / NEPA-UNICAMP. 2. ed. (Campinas:SP: NEPA-UNICAMP) 113p.

Teresa-Neto, M. (2006). Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. *Acta Pediatr Portug* 1, 23-26.

Tollara, M.N., Benecker, M.J.S., Carvalho, G.D., and Corrêa, M.S.N.P. (2005). Aleitamento natural. In *Odontopediatria na 1ª infância*, M.S.N.P. Corrêa. (São Paulo: Santos) pp.83-98.

Veiga, R.K.A., Melo-Júnior, M.R., Araújo-Filho, J.L.S., Mello, L.A., and Pontes-Filho, N.T. (2007). Alterações morfométricas no timo, baço e placas de Peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. *Rev Eletrôn Farm* 4, 32-42,.

Venegas, S.V. (1992). Concentración de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en colostro e leche de tercer mes durante dalactancia exclusiva. *Resumenes XIX Congreso Pediatrico. Rev Chil Ped* s.63- 66.

Vidueiros, S.M., Fernandez, I., Slododianik, N., Roux, M.E., and Pallaro, A.(2008). Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the intestinal villi in growing rats. *Nutrition*, 24, 575-581.

Vieira, G.O., Silva, L.R., and Vieira, T.O. (2003). Alimentação infantil e morbidade por diarreia. *J Pediat* 79, 449-454.

Vinagre, R.D.; and Diniz, E.M.A. (1999). Análise crítica do uso de leite humano procedente de Banco de Leite Humano na alimentação recém-nascido prematuro. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: USP.

Wang, J. F.; and Spitzer, J. J. (1997). Alcohol-induced thymocyte apoptosis is accompanied by impaired mitochondrial function. *Alcohol* 14, 99-105.

Wintergerst, E.S., Maggini, S., and Hornig, D.H. (2007). Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metabol* 51, 301-323.

Xanthou, M. (1998). Immune protection of human milk. *Biol Neon* 74, 121-133.

Zacaroni, L.M., Cardoso, M.G., Saczk, A.A., Santiago, W.D., and Dos- Anjos, J.P. (2010). Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardente de cana. *Quim. Nova*, 10, 1-5.

Tabela 1- Composição das dietas oferecidas durante a lactação (g/100)

Ingredientes	AIN-93G (g/100)*	Dieta experimental (g/100)§
Amido de milho	39,74	-
Caseína (proteína >85%)	20,00	-
Amido dextrinizado (90-94% de sacarídeos)	13,20	-
Sacarose	10,00	-
Óleo de soja ^b	7,00	6,00
Celulose	5,00	1,55
Feijão	-	25,00
Farinha de mandioca	-	37,50
Frango	-	12,00
Arroz	-	15,00
Mix de mineral (AIN-93G)	3,5	1,70
Mix de vitaminas (AIN-93G)	1,00	1,00
L-metionina	0,30	-
Bitartarato de colina (41,1% de colina)	0,25	0,25
TBHQ, MG	0,0014	-
Total (g)	100	100
Kcal/100	3,77	3,78
Proteínas	17,8	17,9
Carboidratos	64,4	61,0
Lipídios	7,00	7,00
Ácidos graxos saturados	10,8	16,7 ^c
Ácidos graxos polinsaturados	40,5	60,9 ^c
Ácidos graxos Monoinsaturados	16,3	24,6 ^c
Carboidratos complexos	360,1	140,5 ^d
Carboidratos simples	236,1	121,5 ^d

* Fonte: Reeves et al., 1993 (adaptado); § Mistura baseada na ingestão alimentar da população do Nordeste brasileiro, composta por: feijão cariquinho (*Phaseolus vulgaris L.*), arroz polido (*Oriza sativa L.*), farinha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*), frango de granja (*Gallus galinaceo*) e óleo de soja. ^a O feijão, o arroz e o frango foram cozidos em água, separadamente, durante duas horas, posteriormente dessecados em estufa (60°C), por 12h, e pulverizados em moinho (Floor Grind – Chuo Boeki Kaisha), para obtenção das respectivas farinhas. ^bObtido no comércio local. ^cDeterminações realizadas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos - UFPE, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005). ^c Teor de ácidos graxos dos alimentos, obtidos a partir da Tabela brasileira de composição de alimentos (Taco), 2006. ^d Quantidade de carboidratos simples e complexos (Fonte: Fundação IBGE-Endef, 1996). TBHQ= antioxidante.

Tabela 2 – Parâmetros imunológicos de ratos lactentes expostos a solução hidroalcoólica de aguardente (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo e o gênero

Variável	Sexo	Grupo				Valor de p
		GDE	GDEA	GC	GCA	
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
		(AB)	(AB)	(A)	(B)	
Leucócitos Totais	Masculino	2433,33 ± 668,95	1966,67 ± 1027,13	2944,44 ± 2451,08	1122,22 ± 222,36	p ⁽¹⁾ = 0,002*
	Feminino	2100,00 ± 788,99	2233,33 ± 1177,92	2911,11 ± 2406,99	1055,56 ± 515,05	p ⁽²⁾ = 0,900 p ⁽³⁾ = 0,936
		(AB)	(AB)	(A)	(B)	
Neutrófilos Segmentados	Masculino	880,67 ± 501,49	906,44 ± 757,55	1032,22 ± 1087,48	407,11 ± 245,37	p ⁽¹⁾ = 0,012*
	Feminino	965,33 ± 426,20	899,67 ± 680,92	1228,00 ± 1132,77	293,89 ± 236,38	p ⁽²⁾ = 0,812 p ⁽³⁾ = 0,927
		(A)	(AB)	(A)	(B)	
Eosinófilos	Masculino	-	-	142,00 ± 39,40	-	**
	Feminino	-	-	83,33 ± 49,33	-	**
		(A)	(AB)	(A)	(B)	
Monócitos	Masculino	78,22 ± 40,32	65,89 ± 34,29	92,67 ± 48,74	50,67 ± 30,36	p ⁽¹⁾ = 0,020*
	Feminino	88,67 ± 48,01	88,00 ± 62,35	77,89 ± 34,72	40,22 ± 25,24	p ⁽²⁾ = 0,854 p ⁽³⁾ = 0,513 **
		(A)	(A)	(B)	(A)	
Linfócitos	Masculino	1474,44 ± 319,97	1012,11 ± 381,51	1882,33 ± 1169,88 ^l	678,89 ± 178,52	p ⁽¹⁾ < 0,001*
	Feminino	1060,89 ± 386,89	1245,67 ± 739,38	2329,44 ± 1707,70	796,56 ± 442,04	p ⁽²⁾ = 0,623 p ⁽³⁾ = 0,454

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. p⁽¹⁾: Através do teste F (Anova) para comparação entre os grupos. p⁽²⁾: Através do teste F (Anova) para comparação entre os sexos. p⁽³⁾: Através do teste F (Anova) para a hipótese de interação sexo e grupo. Obs.: Se todas as letras maiúsculas entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significante entre os grupos correspondentes através das comparações pareadas de Tukey. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental e álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína e álcool.

Tabela 3 – Área dos folículos linfóides do baço e da medula do timo (pixels) de ratos lactentes expostos a solução hidroalcoólica de aguardente (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo.

Variável	<i>Grupo</i>				P
	GDE	GDEA	GC	GCA	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Baço	35.156,25 ± 12.661,71 ^(A)	19.557,83 ± 3.514,58 ^(B)	29.693,08 ± 17.812,12 ^(AB)	29.187,25 ± 12.368,11 ^(AB)	p ⁽¹⁾ =0,035*
Timo	30.619,92 ± 11.123,43	22.228,50 ± 8.458,87	30.039,92 ± 14.673,98	33.583,58 ± 12.112,14	p ⁽¹⁾ = 0,124

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. (1): Através do teste F (Anova). Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes através das comparações pareadas de Tamhane's T2. Área dos folículos expressas em pixels. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental e álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína e álcool.

Figura 1

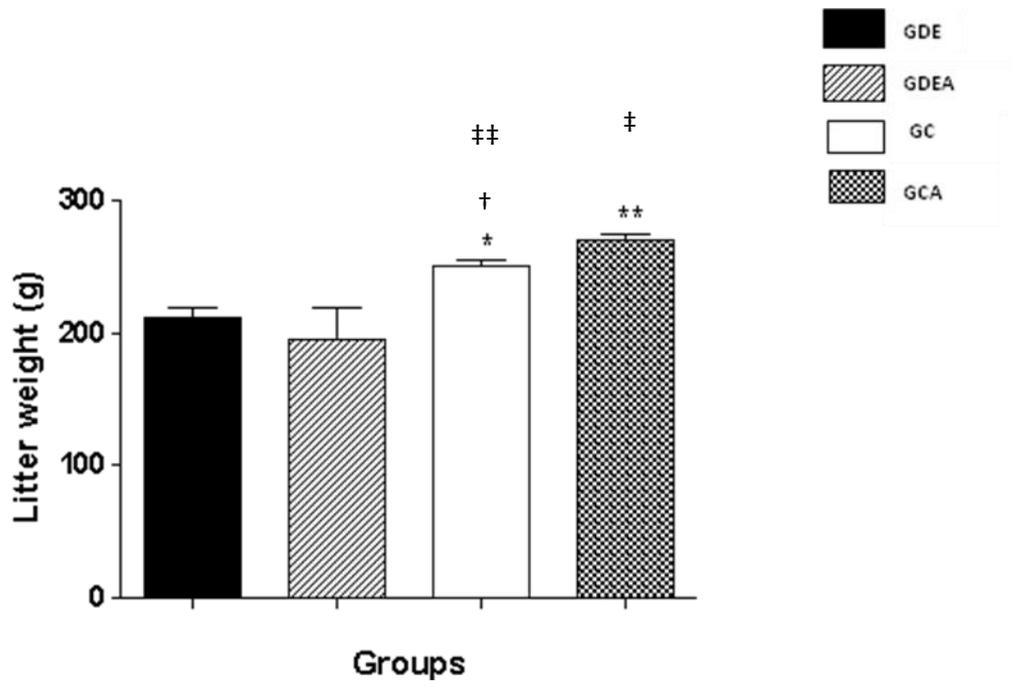


Figura 2

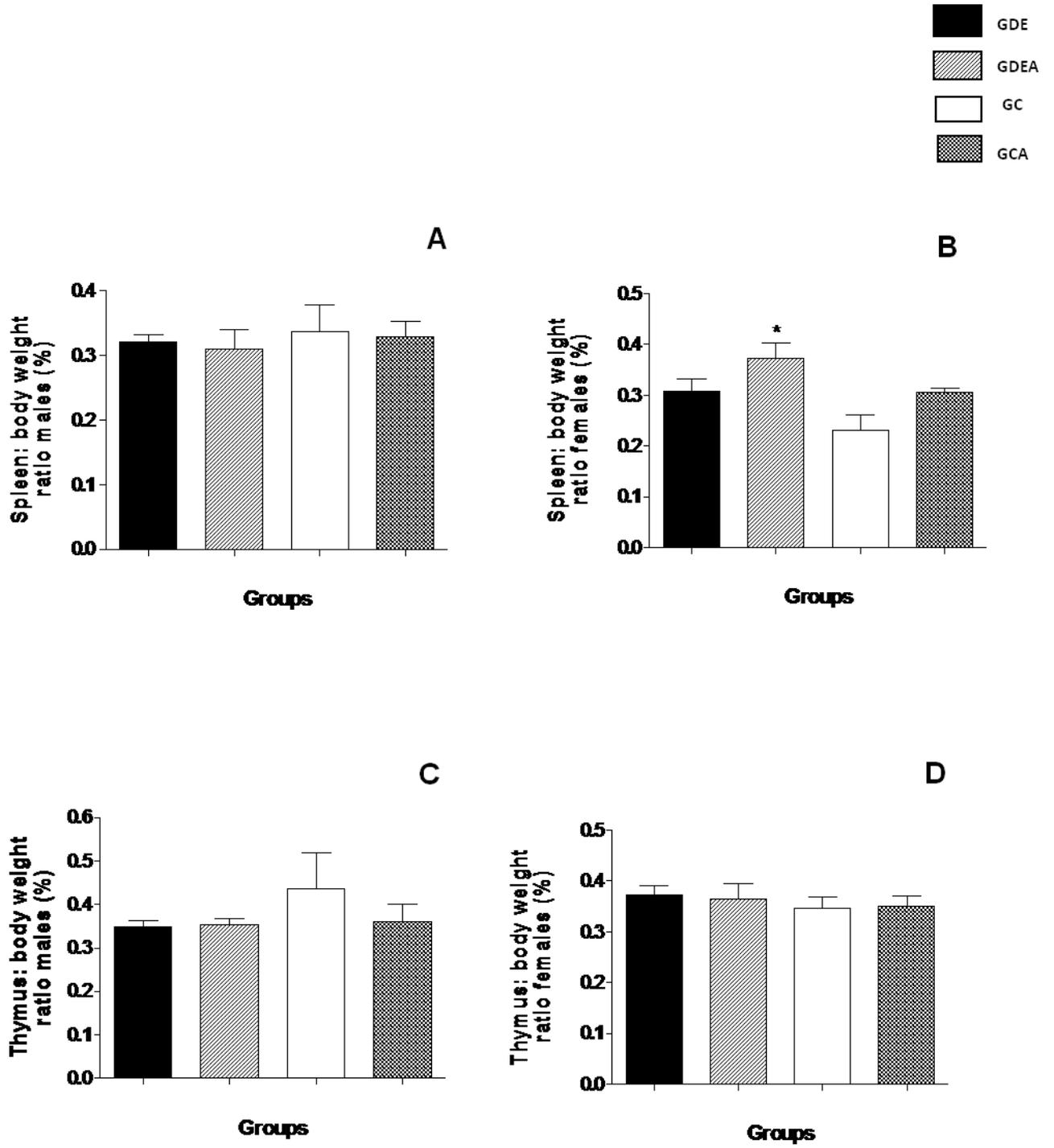
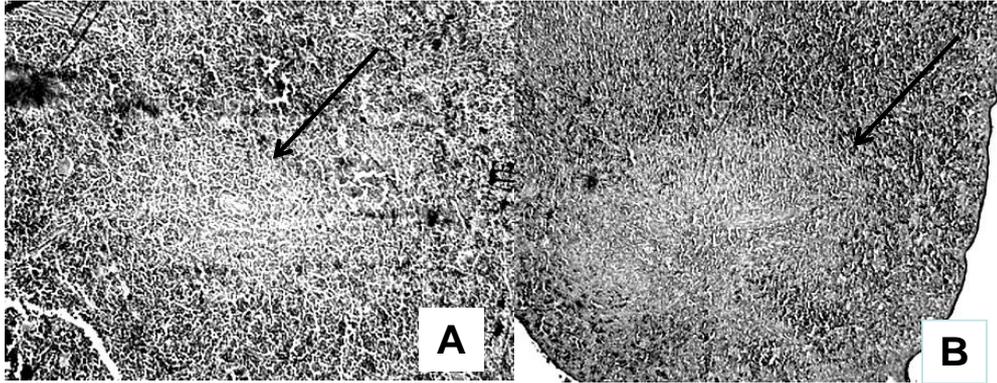


Figura 3



Legendas das figuras

Figura 1- Peso das ninhadas (21 dias) expostos a uma solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v) associada a uma dieta experimental, segundo o grupo e o gênero. *= GC x GCA; **= GCA x GDE; ‡ = GCA x GDEA; ‡‡ = GC x GDE; † =GC x GDEA.

Figura 2- Peso relativo do timo e do baço de ratos lactentes expostos a solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo e o gênero. *= Diferença significativa ($p=0,025$) entre as fêmeas do GDEA e GC. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental e álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína e álcool.

Figura 3- Caracteres histológicos dos baços das lactentes (fêmeas) do GDEA (A) e GDE (B). Verifica-se uma menor área dos folículos linfóides do grupo GDEA. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental e álcool.

Artigo II - Efeitos nutricionais e metabólicos em lactentes expostos a ingestão materna de aguardente associada a uma dieta experimental: estudo em ratos.

Submetido (Anexo D), como artigo original, segundo as normas (Anexo E) da *Revista Paulista de Pediatria*. Classificada como qualis nacional B4 pela Capes (ano de 2010).

Carta de Capa

Título do trabalho: “**Efeitos nutricionais e metabólicos em lactentes expostos a ingestão materna de aguardente associada a uma dieta experimental: estudo em ratos**”.

Autores:

*LUCIANA GONÇALVES ORANGE¹

FRANCISCA MARTINS BION²

CYBELLE ROLIM LIMA¹

DANIELLE CASSIA DE OLIVEIRA³

ANA PAULA BELIZARIO ALVES³

MIDORI CABRAL SUGAYA³

CELIA MARIA MACHADO BARBOSA CASTRO⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória , Núcleo de Nutrição, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco – Brasil;

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição - Laboratório de Nutrição Experimental (LNE), CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco – Brasil;

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição- Curso de Graduação em Nutrição, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco – Brasil;

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Microbiologia - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika), Recife, Pernambuco – Brasil.

Estudo realizado no Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Brasil.

***Autor correspondente:** Núcleo de Nutrição, UFPE, Centro Acadêmico de Vitória, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão- PE- Brasil. Tel.: +55 81 35233351; fax: +55 81 35234520.

E-mail: luciana_orange@hotmail.com (L. Gonçalves de Orange)

Resumo

Objetivo: Avaliar a influência da ingestão de uma bebida alcoólica associada a uma dieta experimental, sobre o estado nutricional de ratas lactantes, seu desempenho lactacional e possíveis consequências sobre o crescimento e desenvolvimento de sua prole. Métodos: Setenta e dois filhotes foram randomizados em quatro grupos (dezoito lactentes- nove machos e nove fêmeas/grupo): GDE (grupo dieta experimental controle); GDEA (grupo dieta experimental álcool); GC (grupo dieta caseína); GCA (grupo dieta caseína álcool). Foram verificados: lactantes - peso, ingestão hídrica e etflica, produção de leite; lactentes- peso, abertura dos olhos e aparecimento de pelos no tronco, proteínas totais séricas, albumina, globulinas, albumina/globulina, AST e ALT. Resultados: A dieta caseína (GC e GCA) promoveu maior peso entre as lactantes, apresentando diferença em relação aos demais grupos aos 21 dias de lactação ($p=0,038$). GCA apresentou aumento na produção de leite no 4º dia de lactação, em relação aos demais ($p=0,038$). Aos 21 dias, foi detectada diferença nos pesos das ninhadas, segundo o grupo ($p=0,001$), GCA apresentou peso superior às demais. Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) foram mais elevadas nos animais expostos ao álcool ($p<0,001$). Foi verificada redução das globulinas nos animais do GCA ($p=0,038$). Conclusões: Os resultados demonstram a importância da restrição de bebidas alcoólicas durante a lactação, principalmente a aguardente de cana-de-açúcar, o que pode comprometer o estado nutricional e metabólico dos lactentes, dependendo das características das dietas associadas a esta ingestão.

Palavras-chave: Álcool, dieta, estado nutricional, lactação, produção de leite.

Abstract

The aim of the present study was to assess the influence of alcohol intake associated to an experimental diet on the nutritional state of lactating rats, lactation development and possible consequences to the growth and development of the offspring. Seventy-two offspring were randomized into four groups (9 males + 9 females in each group): experimental diet group (EDG); alcohol + experimental diet group (AEDG); casein diet group (CDG); and alcohol + casein diet group (ACDG). Among the lactating mothers, weight, water intake, alcohol intake and milk production were analyzed. Among the offspring, weight, opening of eyes, appearance of hair on trunk, total serum proteins, albumin, globulins, albumin/globulin, AST and ALT were analyzed. The casein diet (CDG and ACDG) promoted greater weight among the mothers, with significant differences in comparison to the other groups after 21 days of lactation ($p=0.038$). The ACDG exhibited an increase in milk production beginning on Day 4 of lactation in comparison to the other groups ($p=0.038$). After 21 days, differences in weight were detected between the groups of offspring, with the ACDG exhibiting the greatest weight values of all groups ($p=0.001$). AST and ALT were higher among the animals exposed to alcohol ($p<0.001$). A reduction in globulins was detected in the ACDG ($p=0.038$). The results demonstrate the importance of restricting the ingestion of alcoholic beverages during lactation, as exposure to alcohol can compromise the nutritional and metabolic status of newborns, depending on the characteristics of the diet.

Keywords: Alcohol, diet, nutritional status, lactation, breast milk production

Introdução

O aleitamento materno representa uma das experiências nutricionais mais precoces do recém-nascido (RN), dando continuidade à nutrição iniciada na vida intrauterina. O leite materno (LM) é um alimento nutricionalmente adequado para o RN, adaptado ao seu metabolismo, promovendo seu crescimento e desenvolvimento⁽¹⁾. Além disso, vários fatores bioativos estão presentes no leite humano, entre eles hormônios e fatores de crescimento que vão atuar sobre o crescimento, a diferenciação e a maturidade funcional de órgãos específicos, afetando vários aspectos do desenvolvimento⁽²⁾. Desta forma, o aleitamento é preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), indicado como fonte alimentar exclusiva do bebê, nos seis primeiros meses de vida, e como complemento alimentar, até os dois anos ou mais⁽³⁾.

A passagem de drogas do sangue para o LM ocorre através de mecanismos que envolvem membranas biológicas formadas por fosfolípidios e proteínas. O baixo peso molecular do álcool permite que ele atinja facilmente o LM, atravessando o capilar endotelial materno e a célula alveolar por difusão passiva. Assim, a composição da membrana exerce influência na velocidade da passagem e na concentração do álcool no leite humano⁽⁴⁾. Embora as mulheres que amamentam evitem o uso de drogas, o padrão de consumo do álcool parece não ser alterado, devido à crença, de que o mesmo é galactogênico, ou seja, que o consumo de pequenas quantidades antes do aleitamento facilitaria a produção de leite nas glândulas mamárias⁽⁵⁾. Esta prática é incentivada entre as lactantes de vários países, diferindo do tipo de bebida, geralmente associada a hábitos socioculturais^(6,7). No Brasil, também se recomenda a ingestão de cerveja escura, que não passa pelo processo de filtração e, portanto, contém mais proteínas e lúpulo⁽⁸⁾.

Os prejuízos nutricionais decorrentes do consumo do álcool durante a lactação podem ser devidos ao efeito tóxico desta droga, que passa para o RN através do LM. Esses efeitos podem interferir na quantidade⁽⁴⁾ e composição química do leite⁽⁹⁾, com repercussões sobre os órgãos e sistemas responsáveis pelos processos de digestão, absorção e assimilação dos nutrientes^(10,11). A ingestão de álcool pode tanto promover a desnutrição como o ganho de peso, dependendo do tipo de bebida, dos padrões de consumo do mesmo, do valor energético dos alimentos associados a este consumo, bem como de fatores individuais e genéticos^(4,12).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da ingestão de uma bebida alcoólica associada a uma dieta experimental sobre o estado nutricional de ratas lactantes, seu desempenho lactacional e as possíveis consequências sobre o crescimento e desenvolvimento de sua prole.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizadas ratas gestantes da linhagem *Wistar (Rattus Norvegicus, variedade Albinus)*, do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da UFPE, mantidas em condições-padrão de iluminação ⁽¹³⁾.

O dia do nascimento foi considerado o dia 0. No dia seguinte foi realizada a sexagem e padronização das ninhadas, com um número de seis filhotes / mãe (três machos e três fêmeas). Os animais foram divididos em quatro grupos de igual número (três lactantes / grupo). O total de filhotes estudados foi de setenta e dois.

O estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética de Animais Experimentais do Centro de Ciências Biológicas, UFPE, sob o processo nº 23076.004070/2009-03.

Dietas

O estudo obedeceu a um esquema experimental, delineado em conformidade com os tipos de dietas oferecidas e a presença ou não de ingestão da solução hidroalcoólica de aguardente (40% v/v), diluída a 15%.

A dieta caseína (17%) foi equilibrada de acordo com a AIN- 93⁽¹⁴⁾ e representou a dieta controle durante a lactação; a dieta experimental foi constituída de alimentos consumidos frequentemente pela população brasileira, principalmente na região Nordeste.

Os alimentos constituintes da dieta experimental, assim como as bebidas alcoólicas, foram adquiridos de uma única vez (mesmo lote), no comércio local. Posteriormente, foram cozidos, desidratados e transformados em farinhas, que foram misturadas e oferecidas em forma de *pellets*. A composição centesimal dos alimentos utilizados na dieta foi determinada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Leaal) do Departamento de Nutrição/UFPE, utilizando a metodologia do Instituto Adolfo Lutz – IAL ⁽¹⁵⁾, equilibrada de acordo com a AIN 1993, segundo as recomendações para animais de laboratório (roedores) na lactação ⁽¹⁴⁾ e encontra-se expressa na tabela 1.

Delineamento dos Grupos

Grupos Dieta Experimental (GDE)

GDE- Grupo dieta experimental controle: ratas lactantes ingerindo água e dieta experimental *ad libitum*;

GDEA- Grupo dieta experimental + álcool: ratas mantidas, durante a lactação, com dieta experimental e água *ad libitum* e solução de aguardente (15% v/v), por gavagem.

Grupos Caseína (GC)

GC- Grupo Caseína Controle: ratas ingerindo água e dieta de caseína (17%), durante a lactação *ad libitum*;

GCA- Grupo caseína + álcool: lactantes que receberam, durante a lactação, caseína (17%), água *ad libitum* e solução de aguardente (15% v/v), por gavagem.

Crescimento e desenvolvimento dos animais

O peso das lactantes foi acompanhado diariamente e o das ninhadas, de três em três dias, até o 21º dia do nascimento. Também foi observado o aparecimento de pelos no tronco (registrado o dia de vida em que apareceram os pelos), a abertura dos olhos (número de filhotes da ninhada que abriram os olhos no 12º dia de vida), parâmetros considerados marcadores de desenvolvimento dos animais sob experimentação.

Ingestões hídricas e etílicas dos animais

A solução hidroalcoólica de aguardente a 15% v/v foi administrada às lactantes através de gavagem diária (3g de etanol/Kg/dia), no horário das 08:00 às 10:00h.

Os grupos controle (caseína e dieta experimental) receberam também parte da água consumida diariamente, através de gavagem (mesmo volume da solução alcoólica), para que essas lactantes fossem submetidas ao mesmo estresse dos demais grupos. O controle da quantidade de água oferecida *ad libitum* foi realizado todos os dias.

Produção de leite

A produção láctea foi avaliada segundo Sampson e Jansen ⁽¹⁶⁾, no 4º, 8º e 12º dia de lactação, através da seguinte equação:

$$\text{Produção láctea (g/filhote/dia)} = 0,0332 + 0,0667 (\text{peso inicial}) + 0,877 (\text{ganho em peso})$$

Ressalta-se que o ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso final (após a mamada) e o peso inicial (antes da mamada).

Sacrifício dos animais e análises bioquímicas

Ao final do período experimental, os lactentes foram separados de suas mães para realização do jejum (12 horas). No dia seguinte foram decapitados, para coleta das amostras de sangue utilizadas para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. As análises foram realizadas no Laboratório da Unidade de Análises Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, através de kits comerciais, utilizando protocolos-padrão, de acordo com as instruções dos fabricantes.

As dosagens foram realizadas de acordo com os seguintes métodos:

Proteínas totais: Determinadas pelo método de Gornall, Bardawill e David ⁽¹⁷⁾.

Albumina: Dosadas pela metodologia de ligação com corantes, sendo utilizado o verde de bromocresol.

Globulinas: Dosadas através da subtração dos valores individuais de proteína total e albumina sérica.

AST e ALT: Determinados pela metodologia de Reitmann Frankel ⁽¹⁸⁾.

Análises estatísticas

Na análise dos dados foram obtidas as médias e o desvio padrão e utilizados os testes estatísticos: F (Anova), com um e dois fatores e médias repetidas. No caso de diferenças entre os grupos, as comparações foram realizadas pelo teste de Tukey e, no caso de incoerência entre os resultados, utilizou-se o Least Significance Difference (LSD). Na ocorrência de diferença através do teste de Kruskal-Wallis, foram utilizadas as comparações do referido teste (Conover, 231) e as comparações de Bonferroni, quando houve diferenças entre os tempos de avaliação.

O nível de significância foi de 5,0%. Os dados foram analisados pelo software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), na versão 15.

Resultados

Na tabela 2 verifica-se que, em relação ao peso das lactantes, só houve diferença entre os grupos ao final do período experimental ($p=0,038$), quando as lactantes dos grupos caseínas (GC e GCA) apresentaram peso corporal superior às daquelas da dieta experimental (GDE e GDEA).

Quanto à ingestão hídrica materna, os dados demonstram (Tabela 3) que não houve diferença deste parâmetro em nenhuma das avaliações (total, semanal e entre os grupos).

No que concerne à produção de leite (Figura 1), foi constatada diferença entre os grupos, no 4º dia de lactação ($p=0,038$), sendo a média do GCA superior aos demais ($1,01 \pm 0,28$).

Na análise da quantidade de leite produzida (4º, 8º e 12º dia) observou-se uma produção crescente entre os grupos GDE, GC, GCA ($p < 0,001$). No GDEA a quantidade de leite só aumentou do 4º para o 8º dia ($p < 0,001$), porém não diferiu do 8º para o 12º dia de lactação.

Ao final do período experimental, foi detectada diferença nos pesos das ninhadas segundo o grupo ($p=0,001$). A ninhada do GCA apresentou peso superior às demais ($270,07 \pm 6,88$), inclusive ao seu controle (GC= $250,57 \pm 6,87$). As ninhadas do GC apresentaram peso superior aos animais que ingeriram a dieta experimental (GDE= $211,87 \pm 11,71$ e GDEA= $195,51 \pm 40,80$). Não foi observada diferença entre GDE e GDEA (Figura 2).

Na avaliação do ganho em peso das ninhadas entre as semanas, pôde ser verificado que, naquelas do GDE (controle e álcool), a diferença no ganho de peso ocorreu apenas da 1ª para a 2ª semana (GDE- $p=0,001$; GDEA- $p=0,013$). Entretanto, nos grupos que receberam a dieta caseína observou-se diferença no ganho em peso da 1ª para a 2ª semana e desta para a última ($p < 0,001$).

Quando foi avaliado o ganho em peso ao final do período, constatou-se diferença entre os grupos (caseína e dieta experimental), porém as ninhadas expostas ao álcool não diferiram de seus controles ($p=0,003$).

No que diz respeito aos marcadores de desenvolvimento nos lactentes (Tabela 4), não foi evidenciada diferença em nenhum dos parâmetros.

Os parâmetros bioquímicos avaliados estão apresentados na tabela 5, verificando-se diferença entre os grupos, no que diz respeito às transaminases hepáticas (AST e ALT). Pode ser observado que os animais

expostos ao álcool (GDEA e GCA) apresentaram médias maiores dessas variáveis em relação aos grupos controles.

Quanto às proteínas plasmáticas, a única alteração verificada foi a redução das globulinas nos animais do GCA ($p=0,038$).

Discussão

Circunstancialmente, o LM pode servir como veículo para substâncias nocivas, como o álcool, que podem causar prejuízos para a saúde da criança e da nutriz ⁽¹⁹⁾.

No presente trabalho foram verificadas algumas alterações no estado nutricional materno e de seus descendentes. Azara *et al.* ⁽⁹⁾, estudando os efeitos da ingestão de uma dieta líquida com etanol (Lieber-de-Carli) ⁽²⁰⁾, *ad libitum*, por ratas lactantes (14 dias), sobre a composição do seu leite, verificaram ganho de peso, nas lactantes expostas ao álcool, em relação ao seu *pair-fed*. Entretanto, trabalho recente constatou resultados diferentes, utilizando solução de etanol (20% v/v), associado à dieta caseína (AIN-93), durante a gestação e lactação. As lactantes expostas ao etanol apresentaram redução significativa em relação aos demais grupos (*pair-fed* e controle). Na análise do peso ao nascer não foi verificada diferença entre os lactentes dos diversos grupos, o que não ocorreu ao final da lactação, em que os animais dos grupos *pair-fed* e álcool tiveram seus pesos diminuídos, sendo exacerbado este efeito no grupo etanol ⁽¹⁰⁾.

Os achados dos trabalhos citados divergiram dos aqui apresentados, provavelmente devido aos diferentes desenhos experimentais, visto que na presente pesquisa o peso das mães expostas ao álcool não diferiu do seu grupo controle, em nenhum momento do período experimental. As lactantes que receberam a dieta caseína (controle e álcool) tiveram peso superior, como também apresentaram uma perda de peso inferior aos animais que receberam a dieta experimental, apesar de não ter sido confirmada diferença entre os grupos (Tabela 2). Vale salientar que os resultados em pesquisas que avaliam as repercussões do uso do álcool na lactação são controversos e variam conforme forma de exposição (aguda ou crônica), o percentual de etanol e a forma de administração das bebidas. Portanto, essas diferenças podem interferir na contribuição calórica do álcool, promovendo ou não o ganho de peso nos animais.

Ainda há controvérsias sobre a utilização das calorias do etanol, a depender da ingestão aguda ou crônica desta droga. ^(12,21). Outro fator que pode contribuir para as diferenças na utilização dessas calorias é a relação entre o estado nutricional e a concentração alcoólica das bebidas. A literatura mostra que, em ratas bem nutridas, as bebidas com menores concentrações alcoólicas promovem ganho de peso. No entanto, na ingestão de soluções com concentrações a partir de 20% v/v, esses

animais começam a perder peso de forma gradual, à medida que as concentrações vão aumentando. Os autores atribuem esta perda de peso a uma maior desidratação, quando expostos a uma única fonte de líquidos contendo etanol e sua conhecida ação anoréxica (12), além da toxicidade dos metabólitos, no consumo de soluções mais concentradas, o que pode prejudicar órgãos do sistema digestório, envolvidos na digestão e utilização dos nutrientes da dieta fato, já constatado em outros trabalhos^(10,11,22).

Deste modo, parece que o período de exposição do atual estudo (lactação), a forma de administração da droga (gavagem) e a diferença na composição (fontes alimentares) das dietas justificam as diferenças encontradas entre o peso corporal das lactantes. Na análise das dietas ofertadas, pode ser observado que as mesmas possuem o mesmo valor calórico, no entanto diferem na qualidade dos carboidratos e gorduras^(23, 24). Vale salientar que os carboidratos que compõem a dieta caseína favorecem uma maior carga glicêmica⁽²⁵⁾. Sabe-se que a quantidade de carboidrato das dietas e o índice glicêmico dos alimentos envolvidos, interferem na carga glicêmica das refeições, o que pode proporcionar um maior ganho em peso em humanos e animais^(26,27). Assim, estes fatores podem ter promovido um maior peso nas lactantes que receberam a dieta caseína. É importante destacar que a bebida utilizada é também rica em açúcares, o que pode ter contribuído para o aumento de peso nos animais. Ressalta-se ainda que o álcool *per se* não causou desidratação nas lactantes, o que poderia ter interferido também no peso dos animais⁽¹²⁾.

No que concerne à produção de leite e sua repercussão no peso das ninhadas, o álcool proporcionou um aumento apenas no 4º dia de lactação no GCA, o que parece não ter se refletido no ganho de peso dos lactentes neste período (primeiros sete dias). Porém, é importante reforçar que, no GCA, as ninhadas apresentaram um peso superior às demais, ao final do período experimental (21 dias), embora não tenha sido observada interferência na produção de leite nos demais dias. Não obstante, Azara et al.⁽⁹⁾ detectou uma menor quantidade de leite nos animais expostos à dieta Lieber de Carli, durante a lactação por 14 dias, porém só foi registrado redução a partir do 10º dia, no entanto, só houve diminuição no peso dos lactentes ao final do período experimental⁽¹³⁾. Outro estudo, avaliando o efeito da ingestão crônica de uma solução de etanol (20% v/v) durante a gestação ou lactação, sobre a absorção e excreção de zinco em filhotes, encontrou redução na produção de leite nos animais, ao

final do período estudado (21 dias), sendo esta mais pronunciada quando o etanol foi ingerido na lactação, o que refletiu no peso dos lactentes ⁽²⁸⁾.

As divergências entre os achados da presente pesquisa e das anteriormente citadas podem ser atribuídas às diferentes técnicas utilizadas na avaliação da produção de leite e/ou ao tipo de exposição à droga, como também à diferença entre as concentrações alcoólicas, o que pode ter refletido diferentemente no peso dos lactentes. Ainda é importante destacar sobre a composição das dietas e da bebida alcoólica, o que provavelmente pode ter modificado a composição dos nutrientes do leite, o que também já foi evidenciado ^(9,10).

Na avaliação dos marcadores de desenvolvimento nos lactentes, não foi detectada diferença nos parâmetros estudados, embora tenha sido observado um retardo no aparecimento de pelos dos animais expostos ao álcool. Entretanto, Burgos *et al.* ⁽²⁹⁾ verificaram atraso significativo do dia de aparecimento de pelos (8º dia) do grupo tratado com cerveja de forma contínua, em relação aos demais grupos. Recente trabalho, também verificou que animais expostos ao etanol (44% das calorias advindas do etanol) durante a gestação, não apresentaram diferença no tempo da abertura dos olhos em comparação ao seu controle nos dias de avaliação (12ª a 15º dia de lactação) ⁽³⁰⁾. Acredita-se que as diferenças encontradas para as referidas variáveis se devem ao tipo de exposição à droga, que, quando ininterrupta, provavelmente promove uma maior e constante alcoolemia e pode afetar de forma mais intensa alguns parâmetros ⁽³¹⁾.

Os principais exames laboratoriais indicados para investigar a injúria hepática são o aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gamaglutamiltransferase (GGT), albumina sérica, dentre outros ⁽³²⁾.

Nos nossos resultados, embora tenha havido um aumento na AST e ALT, não houve grandes alterações na síntese das proteínas plasmáticas, com exceção das globulinas. Vale salientar que esta proteína tem grande participação no transporte de várias substâncias, principalmente os anticorpos ⁽³³⁾.

Oyama *et al.* ⁽³⁴⁾, estudando os efeitos de uma exposição alcoólica com diferentes concentrações (5%, 10% ou 20%), até o 12º dia de lactação, verificaram diminuição das proteínas totais nos lactentes expostos a solução à 20%. No entanto, Burgos *et al.* ⁽²⁸⁾, não constatou alteração

nas proteínas séricas analisadas (proteínas totais e albumina), em animais expostos a bebidas alcoólicas a 5 % (cerveja e etanol P.A).

Portanto, os resultados do presente trabalho demonstram que a ingestão da bebida proporcionou injúria hepática; no entanto, este comprometimento não foi suficiente para alterar a síntese de todas as proteínas em estudo, provavelmente pelo modelo experimental utilizado, que difere de outros utilizados na literatura. Considera-se importante, entretanto, a avaliação de outros parâmetros bioquímicos e morfológicos do comprometimento hepático, para que sejam comprovadas tais suposições.

Diante dos resultados apresentados, considera-se importante a restrição de bebidas alcoólicas durante a lactação, principalmente a aguardente de cana-de-açúcar, vez que sua ingestão pode comprometer o estado nutricional e metabólico dos lactentes, dependendo das características das dietas associadas.

Referências

1. Giugliani ERJ. O aleitamento materno na prática clínica. *J Pediat.* 2000; 76 (Supl. 3): 238-52.
2. Hirai, C, Ichiba, H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *J Pediat Gastroenter Nutr.* 2002; 34 (5): 524-8.
3. WHO. The World Health Organization's infant-feeding recommendation. *Bull WHO.* 1995; 73: 165-74.
4. Kachani AT, Okuda LS, Barbosa ALR, Brasileiro S, Hochgraf PB. Aleitamento materno: quanto o álcool pode influenciar na saúde do bebê? *Rev Pediat.* 2008; 30 (4): 249-56.
5. Del Ciampo, LA, Ricco RG, Ferraz IS, Daneluzzi JC, Mertinelli-Junior CE. Prevalência de tabagismo e consumo de bebida alcoólica em mães de lactentes menores de seis meses de idade. *Rev Paul Pediat.* 2009; 27(4): 361-5.
6. Ichisato SMT, Shimo AKK. Aleitamento materno e as crenças alimentares. *Rev Latinoamer Enf.* 2001; 9: 70-6.
7. Menella J. Alcohols effect on lactation. *Alcoh Res Health.* 2001; 25:230-4.
8. Companhia de Bebidas das Américas (Ambev). Cervejas-Caracu. Disponível em:[HTTP://WWW.ambev.com.br/pro_25.htm](http://WWW.ambev.com.br/pro_25.htm) Acesso em: 26 mar. 2011.
9. Azara CRP, Maia IC, Rangel CN, Silva-Neto MAC, Serpa RFB, De Jesus EFO. Ethanol intake during lactation alters milk nutrients composition and growth and mineral status of rat pups. *Biol Res.* 2008; 41: 317-30.
10. Ojeda ML, Vazquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. *Internat J Environ Res Publ Health.* 2009; 6: 2139-49.
11. Melo Júnior MR, Patu VJRM, Araújo Filho JLS, Silva RB, Pontes Filho NT. Efeitos da desnutrição e consumo crônico de etanol sobre o perfil histológico do pâncreas de ratos recém-natos. *Rev Paraen Med.* 2007; 21 (4): 23-9.
12. Aguiar AS, Da-Silva VA, Boaventura GT. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37:841-6.

13. Merusse JLB, Lapichick VBV. Instalações e equipamentos. In: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo:EPM; 1996. p. 15-25.
14. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-1993. Purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76^A rodent diet. J Nutr. 1993; 123 (10):1939-51.
15. Instituto Adolf Lutz.Normas analíticas. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4^aed. São Paulo; 2005.
16. Sampson DA, Jansen GR. Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and wight gain. J Pediat Gastroenter Nutr. 1984; 3: 613-7.
17. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J Biol Chem. 1949; 177:751-66.
18. Reitman S, Frankel AS. A colorimetric method for the determination of serum glutamic, oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Amer J Clin Pathol. 1957; 28(56): 56-63.
19. Del Ciampo LA, Ricco RG, Almeida CA. Aleitamento materno: passagens e transferências mãe-filho. São Paulo: Atheneu; 2004.
20. Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration:1989 update. Alcoh Alcohol. 1989; 24:197-211.
21. Pirola RC, Lieber CS. Hypothesis: energy wastage in alcoholism and drug abuse: possible role of hepatic microsomal enzyme. Amer J Clin Nutr. 1976; 29: 90-3.
22. Bode C, Bode JC. Alcohol,s role in gastrointestinal tract disorders. Alcoh Health Res World. 1997; 21:76-83.
23. Tabela Brasileira de composição de alimento (2006) / NEPA-UNICAMP. 2. ed. (Campinas:SP: NEPA-UNICAMP) 113p.
24. Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Estudo Nacional da Despesa Familiar. Tabela conteúdo de carboidratos totais de alguns alimentos, 1996.p.24-7.
25. Galgani J, Aguirre C, Díaz E. Acute effect of meal glycemic index and glycemic load on blood glucose and insulin responses in humans. Nutr Journal. 2006; 5(22): 1-7.

26. Sampaio HAC, Silva BYC, Sabry MOD, Almeida PC. Índice glicêmico e carga glicêmica de dietas consumidas por indivíduos obesos. *Rev Nutr.* 2007; 20: 615-24.
27. Thomazi F, Ribas A, Serpa E, Slobodian L, Bizi P, Mahfoud R, et al. Avaliação dos componentes séricos e do ganho de peso de ratos submetidos à dieta com sacarose e à dieta com aspartame. *Rev Unic Biol Saúde.* 2008; 1(3): 37-43.
28. Murillo-Fuentes ML, Artillo R, Ojeda ML, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Effects of prenatal or postnatal ethanol consumption on zinc intestinal absorption and excretion in rats. *Alcoh Alcohol.* 2007; 42(1):.3-10.
29. Burgos MGPA, Bion FM, Campos FACES, Wanderley LG. Efeitos de bebidas alcoólicas no metabolismo e nutrição de ratos lactentes e recém-nascidos. *An Fac Med UFPE.* 2004; 45(1):50-5.
30. Brolese G. Marcadores de desenvolvimento em filhotes de ratas expostas ao álcool no período pré-natal. [Dissertação] Porto Alegre (ME): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
31. French SW. Intragastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J Biomed Sci.* 2001; 8: 20-7.
32. Himmelstein DU, Woolhandler SJ, Adler RD. Elevated SGOT/SGTP ratio in alcoholic patients with acetaminophen hepatotoxicity. *Amer J Gastroenter.* 1984; 79: 18-20.
33. Globulinas. [on line]. Disponível em: www.wikipedia.org. Acesso: março 2011.
34. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Damaso AR, Oller-do-Nascimento CM. Ethanol intake during lactation I. Effects on dams metabolism and pups body weight gain. *Alcohol.* 2000; 21: 195-200.

Tabela 1- Composição das dietas oferecidas durante a lactação (g/100)

Ingredientes	AIN-93G (g/100) *	Dieta experimental (g/100)**
Amido de milho	39,7	-
Caseína (proteína >85%)	20,0	-
Amido dextrinizado(90-94% de sacarídeos)	13,2	-
Sacarose	10,0	-
Óleo de soja [†]	7,0	6,0
Celulose	5,0	1,5
Feijão [‡]	-	25,0
Farinha de mandioca [‡]	-	37,5
Frango [‡]	-	12,0
Arroz	-	15,00
Mix de mineral (AIN-93G)	3,5	1,7
Mix de vitaminas (AIN-93G)	1,0	1,0
L-metionina	0,3	-
Bitartrato de colina (41,1% de colina)	0,25	0,25

Continuação tabela 1

TBHQ, MG	0,0014	-
Total (g)	100	100
Kcal/100g	3,8	3,8
Proteínas (g)	17,8	17,9
Carboidratos (g)	64,4	61,0
Lipídios (g)	7,0	7,0
Ácidos graxos saturados (g) ^{††}	10,8	16,7
Ácidos graxos polinsaturados (g) ^{††}	40,5	60,9
Ácidos graxos monoinsaturados (g)		
††	16,3	24,6
Carboidratos complexos ^{††}	360,1	140,5
Carboidratos simples ^{††}	236,1	121,5
Carga		
Glicêmica [□]	53,1	31,0

* Fonte: Reeves *et al* (adaptado) ⁽¹⁴⁾; ** Mistura baseada na ingestão alimentar da população do Nordeste brasileiro, composta por: feijão carioca (*Phaseolus vulgaris L.*), arroz polido (*Oriza sativa L.*), farinha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*), frango de granja (*Gallus galináceo*) e

óleo de soja. O feijão, o arroz e o frango foram cozidos em água, separadamente, durante duas horas, posteriormente dessecados em estufa (60°C), por 12h, e pulverizados em moinho (Floor Grind – Chuo Boeki Kaisha), para obtenção das respectivas farinhas. †Obtido no comércio local. ‡Determinações realizadas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos - UFPE, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz ⁽¹⁵⁾. ††Teor de ácidos graxos dos alimentos, obtido a partir da Tabela brasileira de composição de alimentos ⁽²³⁾. ††Quantidade de carboidratos simples e complexos (Fonte: Fundação IBGE-Endef, 1996) ⁽²⁴⁾. TBHQ= antioxidante. □ Carga glicêmica calculada segundo Galgani *et al.* ⁽²⁵⁾.

Tabela 2 – Peso das lactantes expostas à solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo.

Dias	<i>Grupos</i>				Valor de p
	GDE	GDEA	GC	GCA	
	Média ± DP ^(†)	Média ± DP ^(†)	Média ± DP ^(†)	Média ± DP ^(†)	
1	261,07 ± 5,77	271,57 ± 39,01	274,20 ± 10,15	294,67 ± 18,41	p^(**) = 0,243
7	260,82 ± 16,76	271,90 ± 42,31	272,96 ± 14,20	295,18 ± 34,91	p^(**) = 0,599
14	247,10 ± 13,03	257,57 ± 34,17	275,02 ± 18,21	294,90 ± 34,40	p^(**) = 0,218
21	233,90 ± 9,53 ^(A)	240,27 ± 22,60 ^(A)	282,44 ± 16,76 _(B)	289,37 ± 32,27 ^(B)	p^(**) = 0,038*
Valor de p	p^(†) = 0,169	p^(†) = 0,116	p^(†) = 0,277	p^(†) = 0,604	
Perda de peso	35,77 ± 21,68	32,10 ± 20,15	18,73 ± 6,12	12,93 ± 10,51	p^(**) = 0,430

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. (†): DP = Desvio padrão. (**): Através do teste

Kruskal Wallis. (†): Através do teste F(Anova) para medidas repetidas. Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes através do referido teste. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína e álcool. Peso em gramas (g).

Tabela 3 – Marcadores de desenvolvimento de lactentes expostos à solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo.

Variável	<i>Grupos</i>				Valor de p
	GDE	GDEA	GC	GCA	
	Média ± DP ^(‡)				
<i>Dia de aparecimento</i>					
<i>dos pelos no tronco</i>	4,33 ± 1,53	5,00 ± 1,73	6,00 ± 2,65	7,00 ± 4,36	p^(*) = 0,700
<i>Número de animais</i>					
<i>com olhos abertos no</i>	-	1,00 ± 1,00	0,33 ± 0,58	1,00 ± 1,73	p^(*) = 0,871
<i>12º dia</i>					

^(‡): DP = Desvio padrão. (*): Através do teste Kruskal Wallis. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína álcool.

Tabela 4 – Variáveis bioquímicas de lactentes expostos à solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo e o gênero.

Variáveis	Sexo	<i>Grupos</i>				Valor de p
		GDE	GDEA	GC	GCA	
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
		(A)	(B)	(AB)	(B)	
AST	M	35,22 ± 21,60	53,89 ± 7,30	45,78 ± 4,35	54,22 ± 11,43	p ⁽¹⁾ < 0,001*
	F	40,89 ± 24,29	61,89 ± 12,99	54,11 ± 4,78	56,00 ± 11,03	p ⁽²⁾ = 0,077
		(A)	(B)	(AB)	(B)	p ⁽³⁾ = 0,890
ALT	M	37,44 ± 22,14	55,89 ± 6,68	48,00 ± 4,53	56,67 ± 11,09	p ⁽¹⁾ < 0,001*
	F	42,78 ± 24,65	64,00 ± 12,98	55,24 ± 5,70	58,33 ± 10,89	p ⁽²⁾ = 0,099
						p ⁽³⁾ = 0,907
AST/ALT	M	0,91 ± 0,07	0,95 ± 0,02	0,97 ± 0,05	0,85 ± 0,30	p ⁽¹⁾ = 0,199
	F	0,93 ± 0,05	0,96 ± 0,02	1,00 ± 0,05	0,97 ± 0,04	p ⁽²⁾ = 0,105
						p ⁽³⁾ = 0,467
PTN-Totais	M	4,93 ± 0,54	4,90 ± 0,89	4,84 ± 0,82	4,69 ± 0,59	p ⁽¹⁾ = 0,187
	F	5,22 ± 0,75	4,87 ± 0,76	4,53 ± 0,86	4,43 ± 0,72	p ⁽²⁾ = 0,655
						p ⁽³⁾ = 0,616
Albumina	M	2,72 ± 0,66	2,63 ± 0,93	2,69 ± 0,72	2,58 ± 0,66	p ⁽¹⁾ = 0,657
	F	3,02 ± 0,84	2,67 ± 0,85	2,78 ± 0,74	2,54 ± 0,65	p ⁽²⁾ = 0,591

Continuação

tabela 4

 $p^{(3)} = 0,923$

		(A)	(A)	(AB)	(B)	
Globulina	M	2,21 ± 0,26	2,39 ± 0,43	2,11 ± 0,61	2,09 ± 0,26	$p^{(1)} = 0,038^*$
	F	2,31 ± 0,31	2,20 ± 0,24	2,01 ± 0,43	1,89 ± 0,23	$p^{(2)} = 0,266$
						$p^{(3)} = 0,590$
Albumina/	M	1,38 ± 0,34	1,49 ± 0,35	1,59 ± 0,40	1,50 ± 0,39	$p^{(1)} = 0,510$
Globulina	F	1,53 ± 0,37	1,73 ± 0,32	1,61 ± 0,35	1,50 ± 0,41	$p^{(2)} = 0,240$
						$p^{(3)} = 0,731$

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. $p^{(1)}$: Através do teste F (Anova) para comparação entre os grupos. $p^{(2)}$: Através do teste F (Anova) para comparação entre os sexos. $p^{(3)}$: Através do teste F (Anova) para a hipótese de interação sexo e grupo. Obs.: Se todas as letras maiúsculas entre parênteses são distintas comprova-se diferença significante entre os grupos correspondentes através das comparações pareadas de Tukey. PTN= Proteína; AST= aspartato amino transferase; ALT= alanina amino transferase; GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína álcool; M= machos; F=fêmeas.

Tabela 5 - Ingestão de água semanal das lactantes expostas à solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo.

Dias	<i>Grupo</i>				Valor de p
	GDE	GDEA	GC	GCA	
	Média ± DP ^(‡)	Média ± DP ^(‡)	Média ± DP ^(‡)	Média ± DP ^(‡)	
1	29,53 ± 1,99	24,67 ± 2,31	39,80 ± 13,78	25,33 ± 18,23	p⁽²⁾ = 0,151
7	35,30 ± 3,43	29,57 ± 5,82 ^(A)	33,67 ± 2,51	37,67 ± 9,90	p⁽²⁾ = 0,392
14	40,40 ± 1,84	33,81 ± 6,15 ^(AB)	41,51 ± 7,27	37,95 ± 2,70	p⁽²⁾ = 0,306
21	51,93 ± 7,64	45,76 ± 10,45 ^(B)	50,43 ± 2,00	53,38 ± 5,71	p⁽²⁾ = 0,622
Valor de p	p⁽³⁾ = 0,063	p⁽³⁾ = 0,033*	p⁽³⁾ = 0,098	p⁽³⁾ = 0,177	
Consumo de					
H₂O no período	896,17 ± 77,49	764,50 ± 189,43	847,07 ± 18,25	860,60 ± 128,86	p⁽²⁾ = 0,824

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. (‡): DP = Desvio padrão. (2): Através do teste Kruskal Wallis. (3): Através do teste F(Anova) para medidas repetidas. Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas comprova-se diferença significativa entre as semanas correspondentes através das comparações pareadas de Bonferroni. H₂O= água; GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína álcool.

Figura 1-

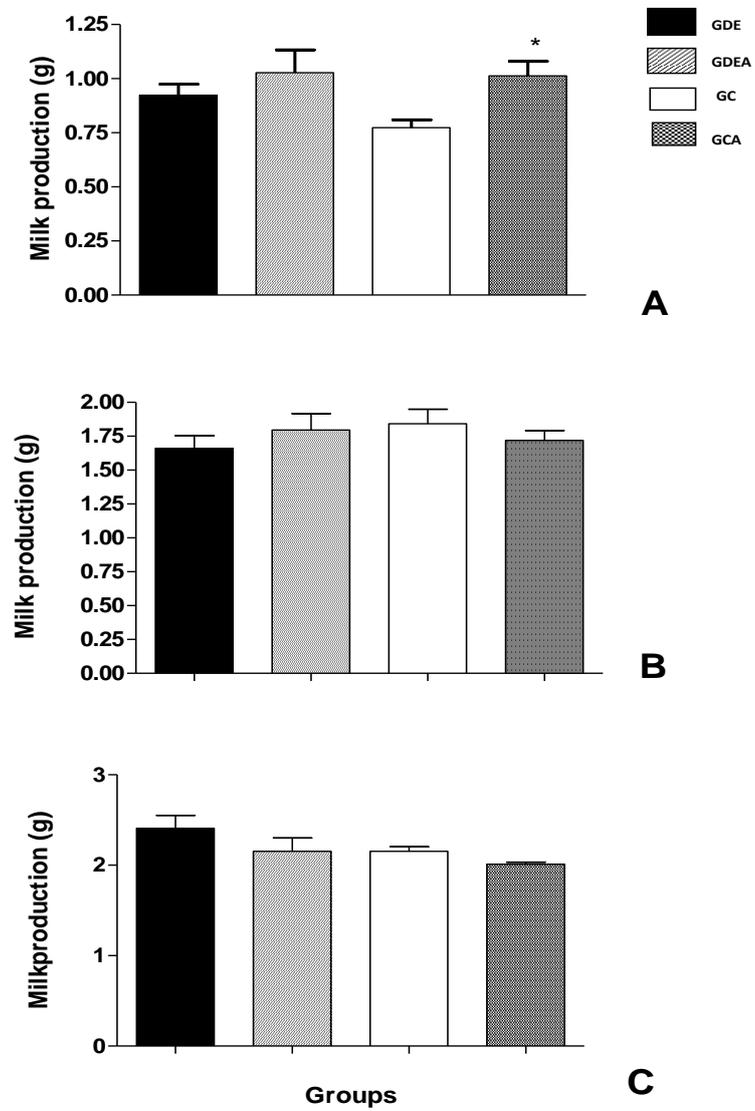
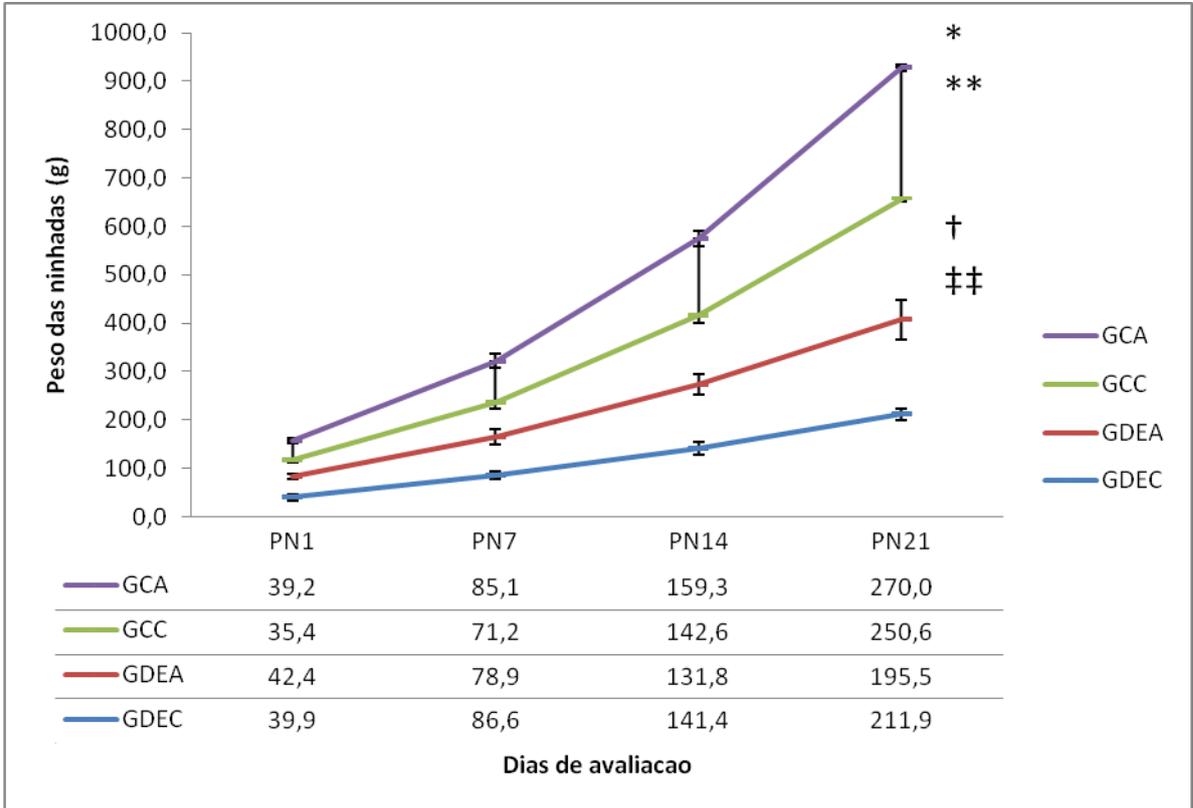


Figura 2-



LEGENDA DAS FIGURAS:

Figura 1- Produção de leite das ratas lactantes expostas a uma solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo. A- Produção no 4º dia de lactação; B- Produção no 8º dia; C- Produção no 12º dia. (*): Diferença significativa ao nível de 5,0%. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental e álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína e álcool.

Figura 2- Curva de peso das ninhadas expostas à solução hidroalcoólica de aguardente de cana-de-açúcar (15% v/v), associada a uma dieta experimental, segundo o grupo e as semanas de avaliação. GDE= Grupo dieta experimental controle; GDEA= Grupo dieta experimental e álcool; GC= Grupo dieta caseína controle; GCA= Grupo dieta caseína e álcool. *= GCA x GC; **= GCA x GDE; ‡ = GCA x GDEA; † = GC x GDE; ‡†=GC x GDEA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados coletados no trabalho, através de análises e inferências, permitem algumas considerações finais sobre o tema estudado:

- Embora as mulheres que amamentam geralmente evitem o uso de drogas, o padrão de consumo parece não ser alterado entre as alcoolistas, devido à crença de que o álcool é galactogênico. Esta prática deve ser desencorajada pelos profissionais de saúde, particularmente o nutricionista, desde o pré-natal;
- Por ser uma droga complexa, o álcool exerce inúmeros efeitos sobre diversos órgãos e sistemas, especialmente em estágios da vida da mulher como a lactação, quando pode trazer prejuízos à sua saúde e de seus descendentes;
- Entre os vários órgãos e sistemas cuja saúde e funcionamento podem ser prejudicados pelo uso do álcool destaca-se o trato gastrointestinal, em particular o fígado, que é atingido em maior intensidade pelo álcool, por ser responsável pela desintoxicação desta droga no organismo. Dessa forma, as reações metabólicas que acontecem neste órgão, bem como a síntese de substâncias com várias ações fisiológicas, como as proteínas plasmáticas, sofrem alterações importantes que podem comprometer o estado nutricional e a saúde geral do indivíduo;
- Pôde ser observado também, no presente trabalho que os parâmetros imunológicos avaliados dos lactentes foram largamente prejudicados pela ingestão do álcool durante a lactação, de forma diferenciada entre os gêneros, demonstrando que este consumo pode repercutir negativamente sobre a sua imunocompetência;
- Ressalta-se que a dieta caseína, embora seja considerada padrão-ouro, em termos nutricionais, para pesquisas com animais, exacerbou os efeitos deletérios do álcool sobre alguns parâmetros imunológicos. Portanto, são necessários mais estudos para verificar se este tipo de dieta é a mais adequada nesses modelos experimentais;
- Em síntese, a ingestão de solução de aguardente de cana- de -açúcar, associada a uma dieta representativa do Nordeste brasileiro, mesmo em um modelo experimental de exposição aguda, provocou danos, sob vários aspectos, à saúde materna e neonatal, que variaram de acordo com o gênero;
- Extrapolando os nossos resultados para o humano, torna-se importante uma adequada orientação nutricional às lactantes, no que diz respeito à quantidade, mas principalmente à qualidade das dietas associadas ou não ao consumo de bebidas alcoólicas, na prevenção de doenças em seus filhos, como a obesidade e suas implicações, como também a deficiência

na imunocompetência dos mesmos, o que já é constatado devido à imaturidade do sistema imune neste estágio de vida.

6. PERSPECTIVAS

Os dados sugerem que um modelo experimental como o utilizado neste trabalho fornece informações valiosas para o planejamento e implementação de programas de intervenção ao etilismo entre as mulheres, especificamente nas campanhas sobre o aleitamento materno no Brasil, particularmente na Região Nordeste.

Assim, sugerimos, como perspectivas para estudos futuros:

- Avaliar a ingestão crônica desta bebida associada à dieta experimental, sobre os mesmos parâmetros estudados neste trabalho;
- Verificar as alterações dos macro e micronutrientes no leite das ratas expostas a este modelo experimental;
- Observar, a longo prazo, os efeitos nutricionais e a resposta imune desses lactentes, quando expostos a agentes patogênicos;
- Investigar os efeitos nutricionais, metabólicos e imunológicos de outros tipos de bebidas alcoólicas, associadas à dieta experimental, em vários estágios de vida;
- Analisar o impacto desta bebida quando associada a dietas com diferentes valores calóricos, bem como a distribuição dos nutrientes sobre a saúde dos animais;
- Identificar os efeitos desta ingestão sobre outros órgãos e tecidos;
- Detectar os níveis de estresse oxidativo em animais expostos à ingestão de bebidas alcoólicas associadas a diferentes dietas.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.S.; DA SILVA, V.A.; BOAVENTURA, G.T. As calorias do etanol são aproveitadas pelo organismo? **Nutrição em Pauta**, p. 45-49, jan/fev. 2007.

AHMED, F.E. Toxicological effects of ethanol on human health. **Critical Reviews in Toxicology**, v.25, n.4, p.347-367, 1995.

ALLANSMITH, M.; McCLELLAN, B.H.; BUTTERWORTH, M.; MALONEY, J.R. The development of immunoglobulin levels in man. **Journal of Pediatric**, v.72, p. 276-290, 1968.

ALVIK, A.; HALDORSEN, T.; LINDEMANN, R.R. Alcohol consumption, smoking and breastfeeding in the first six months after delivery. **Acta Pediatric**, v.95, p.686-693, 2006.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Drugs. The transfer of drugs and other chemicals into human breast milk. **Pediatrics**, v.108, p. 776-789, 2001.

ARRUDA, B.K.G. Padroes alimentares da populacao brasileira. INSTITUTO NACIONAL DE ALIMENTACAO E NUTRICAO-Inan, 1981, 64p.

AZARA, et al. Ethanol intake during lactation alters milk nutrients composition and growth and mineral status of rat pups. **Biological Research**, v. 41, p.317-330, 2008.

BATISTA- FILHO, M.; MIGLIOLI, T.C. Alimentacao e nutricao np Nordeste do Brasil. Publicacoes Cientificas do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (Imip), n.12, 2006, p. 19-21.

BATISTA- FILHO, M.; ROMANI, S.A.M. Alimentacao, Nutricao e Saude no Estado de Pernambuco: especializacao e fatores socio-economicos. Serie de Publicacoes Cientificas do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (Imip), n. 7, Recife, 2002.

BAUTISTA, A.P. Free radicals, chemokines, and cell injury in HIV-1 and SIV infections and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.12, p.1527-1532, 2001.

BELL, R.D. et al. Effects of concurrent access to a single concentration or multiple concentrations of ethanol on ethanol intake by periadolescent high-alcohol-drinking rats. **Alcohol**, v. 33, p.107-115, 2004.

BLACK, R. Micronutrient deficiency: an underlying cause of morbidity and mortality. **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, v.81,n.2, p.79, 2003.

BLUME, S. Women and alcohol: a review. **Journal of the American Medical Association**, v. 256, p.1467-1470, 1986.

BRANDT, C.T.; LEITE, C.R.; MANHÃES-DE-CASTRO, F.M.; MACEDO, E.M.; SILVA, R.P.; CASTRO, C.M.M.B. Níveis de superóxido dismutase produzidos por monócitos em portadores de esquistossomose hepatoesplênica submetidos a

esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico no omento maior. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgiões**, v.34, n.1, p.25-30, 2007.

BRASILIANO, S. Comorbidade entre dependência de substâncias psicoativas e transtornos alimentares: perfil e evolução de mulheres em um tratamento específico para dependência química. 2005. (Tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BRESLOW, R.A.; FALK, D.E.; FEIN, S.B.; GRUMMER-STRAWN, L.M. Alcohol consumption among breastfeeding women. **Breastfeeding Medicine**, v.2, p.152-157, 2007.

BRIENZA, R.S.; STEIN, M.D. Alcohol use disorders in primary care: Do gender-specific difference exist? **Journal of General Internal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 387-397, 2002.

BROWN, L.A.S.; HARRIS, F.L.; PING, X.D.; GAUTHIER, T.W. Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? **Alcohol**, v.33, p.191-197, 2004.

BUDEC, M.; CIRIC, O.; KOKO, V.; ASANIN, R. The possible mechanism of action of ethanol on rat thymus. **Drug Alcohol Dependence**, v.30, n.2, p. 181-185, 1992.

BURGOS, M.G.P.A.; BION, F.M.; CAMPOS, F. Lactação e álcool: efeitos clínicos e nutricionais. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, n.1, p. 25-35, 2004.

BURGOS, M. G. P. A.; BION, F. M.; CAMPOS, F. A. C. E. S.; WANDERLEY, L. G. Efeitos de bebidas alcoólicas no metabolismo e nutrição de ratos lactentes e recém-nascidos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 1, p. 50-55, 2004.

BURGOS, M.G.P.A.; MEDEIROS, M.C.; BION, F.M.; PESSOA, D.C.N.P. Efeitos de bebidas alcoólicas em mães lactantes e suas repercussões na prole. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n.2, p. 129-135, 2002.

CALAMITA Z, BURINI RC. Alterações imunitárias na cirrose hepática alcoólica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 32, n.2, p. 79-84, 1995.

CARLINI, E.A. et al. **II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do País – 2005**: Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CESAR, B.A.L. Alcoolismo feminino: um estudo de suas peculiaridades. Resultados preliminares. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.55, n.3, p.208-211, 2006.

CHANG, S.J. Antimicrobial proteins of maternal and cord sera and human milk in relation to maternal nutritional status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p.183, 1990.

CHANG, G. Alcohol-screening instruments for pregnant women. **Alcohol Research & Health**, v. 25, n. 3, p. 204-209, 2001.

Companhia de Bebidas das Américas (Ambev). Cervejas-Caracu. Disponível em:

[HTTP://WWW.ambev.com.br/pro_25.htm](http://www.ambev.com.br/pro_25.htm) Acesso em: 26 mar. 2011.

COOK, R.T. Alcohol abuse, alcoholism and damage to the immune system. A review. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n. 9, p. 1927-1942, 1998.

CUNHA, C.V. Álcool e amamentação. **Gazeta Clínica**, v. 21, p. 60-62, 1923.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D.F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.115, n.6, p.1119-1128, 2005.

DEACIUC, I.V. Alcohol and cytokine network. **Alcohol**, v.14, n.5, p.421-430, 1997.

DEL CIAMPO, L.A.; RICCO, R.G.; FERRAZ, I.S.; DANELUZZI, J.C.; MERTINELLI-JUNIOR, C.E. Prevalência de tabagismo e consumo de bebida alcoólica em mães de lactentes menores de seis meses de idade. **Revista Paulista de Pediatria**, v.27, n.4, p.361-365, 2009.

DIAZ, L.; MONTERO, A.; GONZÁLEZ-GROSS, M.; VALLEJO, A.I.; MARCOS, A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, (Supl.3), p. S50-53, 2002.

EBRAHIM, S.H.; LUMAN, E.T.; FLOYD, R.L.; MURPHY, C.C.; BENNETT, E.M.; BOYLE, C.A. Alcohol consumption by pregnant women in the United States during 1988-1995. **Obstetric and Gynecology**, v. 92, n. 2, p.187-192, 1998.

ELBREDER, M.F.; LARANJEIRA, R.; SIQUEIRA, M.M.; BARBOSA, D.A. Perfil de mulheres usuárias de álcool em ambulatório especializado em dependência química. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 57, n.1, p.9-15, 2008.

ERJA, I.I. Drug abuse and pregnancy: background. **Acta Anesthesiology Scandinava**, v.47, (Supl.116) p.83, 2003.

FABRI, C.E. **Desenvolvimento e validação de um instrumento de rastreamento do uso nocivo de álcool durante a gravidez (T-ACE)**. 2002. Dissertação [Mestrado em Medicina Social]- Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto, 2002.

- FENECH, M.; STOCKLEY, C.; AITKEN, C. Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide-induced DNA damage. **Mutagenesis**, v.12, p. 289–296, 1997.
- FERREIRA, T.R.B.; RIPAMONTE, C.; STELLA, L.C. ALBADALEJO, R.G.C. Imunologia do leite materno. **Revista Perspectivas Médicas**, v. 9, p. 22-28, jan./dez. 1998.
- FIorentin, C.F.; VARGAS, D. O uso de álcool entre gestantes e os seus conhecimentos sobre os efeitos do álcool no feto. **Revista Eletrônica de Saúde Mental e Drogas**, v. 2, n.2, 2006.
- Fontes, A.; FIGLIE, N. B.; LARANJEIRA, R. O comportamento de beber entre dependentes de álcool: estudo de seguimento. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v 33, n.6, 2006.
- FREYRE, G. Características gerais da colonização portuguesa no Brasil: formação de uma sociedade agrária, aristocrata e híbrida. In: FREYRE, G. Casa Grande & Senzala. 43ª edição. Rio de Janeiro: Record, 2001, p.105-115.
- GAROFALO, R.P.; CHHEDAS, M.E.I.F.; PALKOWETZ, K.H.; RUDLOFF, H.E.; SCHMALSTIEG, F.C.; RASSIN, D.K. Interleukin-10 in human milk. **Pediatric Research**, v.37, p.445-449, 1995.
- GAROFALO, R.P.; GOLDMAN, A.S. Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. **Biology Neonate** , v. 74, p. 121-133, 1998.
- GAROFALO, R.P.; GOLDMAN, A.S. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. **Clinical Perinatology**, v. 26, p.361-377, 1999.
- GIGLIA, R.C.; BINNS, C.W. Patterns of alcohol intake of pregnant and lactating women in Perth, Australia. **Drug and Alcohol Review**, v.26, p.493-500, 2007.
- GIUGLIANI, E.R.J. O aleitamento materno na prática clínica. **Jornal de Pediatria**, v.76, supl. 3, p. S238-252, 2000.
- GLORIA, L.; CRAVO, M.; CAMILO, M.E.; RESENDE, M.; CARDOSO, J.N.; OLIVEIRA, A.G.; LEITÃO, C.N.; MIRA, F.C. Nutritional deficiencies in chronic alcoholics: relation to dietary intake and alcohol consumption. **American Journal of Gastroenterology**, v.92, n. 3, p.485-489, 1997.
- GONZÁLES-GROSS, M.; LEBRÓN, M.; MARCOS, A. *Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud*. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud, 2000.
- GOOD, R. A. Organization and development of the immune system. Relation to its reconstruction. **Annals of the New York Academy of Science**, v.770, p.8-33, 1995.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, p. 751-766, 1949.

GRASSI, M.S.; COSTA, M.T.Z. da; VAZ, F.A.C. Fatores imunológicos do leite humano. **Revista de Pediatria**. v.23 (3), p.258-263, 2001.

GUERRINI, I.; THOMSON, A.D.; GURLING, H.D. The importance of alcohol misuse, malnutrition and generic susceptibility. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.31, n.2, p.212-220, 2007.

HAMOSH, M. Bioactive factors in human milk. **Pediatrics Clinics of North America**, v. 48, p.1-19, 2001.

HANSON, L.A.; WINBERG, J. Breastfeeding as a protection against gastroenteritis and other infections. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v.74, p. 641-642, 1985.

HAWKES, J.S.; BRYAN, D.L.; GIBSON, R.A. Cytokine production by leukocyte from human milk. **Advances in Experimental Medical Biology** , v.478, p.391-392, 2000.

HIRAI, C.; ICHIBA, H.; SAITO, M.; SHINTAKU, H.; YAMANO, T.; KUSUDA, S. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.34, n.5, p. 524-528, 2002.

HIRATA, E. S.; HIRATA, L. C. M. Bioquímica e metabolismo do etanol. *In*: FORTES, J. R. A.; CARDO, W. N. **Alcoolismo: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 1991.p.57-64.

HOCHGRAF, P.B. Problemática do alcoolismo e outras fármaco-dependências nas mulheres. *In*: ANDRADE, A.G.; NICASTRI, S.; TONGUE, E. **Drogas: atualização em prevenção e tratamento**. São Paulo: Loyola; 1993. p. 69-78.

ICHISATO, S.M.T.; SHIMO, A.K.K. Aleitamento materno e as crenças alimentares. *Revista Latino Americana de Enfermagem*, v. 9, p.70-76, 2001.

JASON, J. Breast – feeding in 1991. **New England Journal of Medicine**, v. 325, p. 1036 – 1037, 1991.

JEWELL, S.A.; DI-MONTE, D.; GENTILE, A.; GUGLIELMI, A.; ALTOMARE, E.; ALBANO, O. Decreased hepatic glutathione in chronic alcoholic patients. **Journal of Hepatology**, v. 3, p.1-6, 1986.

JUÁREZ, J.; TOMASI, E.B. Sex difference in alcohol drinking patterns during forced and voluntary consumption in rats. **Alcohol**, v. 19, n.1, p. 15-22, 1999.

KABASHIMA, H.; NAGATA, K.; MAEDA, K.; IJIMA, T. Involvement of substance P, mast cells, TNF-alpha and ICAM-1 in the infiltration of inflammatory cells in human periapical granulomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v.31, p.175-180, 2002.

KACHANI, A.T. Comparação da composição alimentar e do consumo alcoólico entre a fase folicular e a fase lútea tardia de mulheres dependentes de álcool. 2008. **Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2008.

KACHANI, A.T.; BRASILIANO, S.; HOCHGRAF, P.B. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 35 (supl.1) p.21-24, 2008.

KACHANI, A.T.; OKUDA, L.S.; BARBOSA, A.L.R.; BRASILIANO, S.; HOCHGRAF, P.B. Aleitamento Materno: quanto o álcool pode influenciar na saúde do bebê? **Revista de Pediatria**. v.30 (4), p.249-256, 2008.

KALANT, H. Pharmacokinetics of ethanol: absorption, distribution and elimination. In: KISSIN, B.; BEGLEITER, H. (Eds.). **The pharmacology of alcohol and alcohol dependence**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 15-58.

KEER-CORREA, F.; TUCCI, A.M.; HEGEDUS, A.M.; TRINCA, L.A.; OLIVEIRA, J.B. FLORIPES, T.M.F.; KERR, L.R.F.S. Diferenças nos padrões de consumo de álcool entre homens e mulheres em duas comunidades brasileiras distintas. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.30, n.3, p. 235-242, 2008.

KOREN, G.; NULMAN, I. Teratogenic drugs and chemicals in humans. In: KOREN, G. (Ed.). **Maternal fetal toxicology**. New York: Marcell Dekker, 1994. p. 33-48.

KUNZS, C.; PALMERO, M.R.; KOLETZKO, B.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk. Part II: Lipids, micronutrients and bioactive factors. **Clínicas de Perinatologia**, v. 26, p. 335-359, 1999.

Instituto Adolf Lutz. Normas analíticas. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ª ed. São Paulo, 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Estudo Nacional da Despesa Familiar. Tabela conteúdo de carboidratos totais de alguns alimentos, 1996.p.24-7.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orcamentos Familiares (POF) 2002-2003: primeiros resultados: Brasil e grandes Regiões. Rio de Janeiro.

LAIRES, M.J.; MONTEIRO, C. Exercise, magnesium and immune function. **Magnesium Research**, v.21, n.2, p.92-96, 2008.

LANCASTER, F.E. Gender differences in the brain: implications for the study of human alcoholism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**., v. 18, p. 740 -746, 1994.

LANDRET, K. S. Critical windows in development of the rodent immune system. **Human & Experimental Toxicology**, v.21, n.9-10, p.493-498, 2002.

LANDS, W.E. A summary of the workshop “alcohol and calories: a matter of balance”. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 7, p.1338-1341, 1993.

LAU, A.; VON, D. V.; SANDER, M.; MACGUILL, M.; LANZKE, N.; SPIES, C. Alcohol use disorder and perioperative immune dysfunction. **Anesthesia and Analgesia**, v.108, p. 916–920, 2009.

LAURINDO, V.M. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados para a idade gestacional. II- Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. **Pediatria**, v.14, n.1, p.14-23, 1992.

LEONARD, L. et al. Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to trichinella spiralis in female rats. **Alcohol and Alcoholism**, v.34, p.520-528, 1999.

LIEBER, C.S. Biochemical factors in alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 13, p. 136-153, 1993.

_____. Alcohol and the liver. **Gastroenterology**, v. 37, n. 2, p.120-124, 2000.

_____. Ethanol metabolism cirrhosis and alcoholism. **Clinical Chemistry Acta**, v.257, p. 59-84, 1997.

LIMA, L.A.; MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTE, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T. Does the exposition to alcohol in pre and post-natal periods interfere on the formation and maturation of Peyer's patches? **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.47, n.1, p.22-26, 2002.

LIOVERA, D.; RODRÍGUEZ, L.S. Subpoblaciones linfocitárias en preescolares venezolanos de alto nivel socioeconómico. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, p.196-202, 2004.

LITTLE, R.E.; ANDERSON, K.W.; ERVIN, C.H.; WORTHINGTON-ROBERTS, B.; CLARREN, S.K. Maternal alcohol use during breast feeding and infant mental and motor development at one year. **New England Journal of Medicine**, v. 321, p. 425-430, 1989.

LITTLE, R.E.; NORTHSTONE, K.; GOLDING, J. Alcohol breastfeeding and development at 18 months. **Pediatrics**, v.109, p.E72, 2002.

MACEDO, E.M.; AMORIM, M.A.F.; DA SILVA, A.C.S.; CASTRO, C.M.M.B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune das crianças com desnutrição grave. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n.3, p. 329-336, 2010.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M. The importance of zinc in human nutrition. **Revista de Nutrição de Campinas**,v.17, p.79-87, 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 11ª ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 203.

MAIO,R.; DICHI, J.B.; BURINI, R.C. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.37, p.120-124, 2000.

- MALPUECH-BRUGÈRE, C. et al. Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1501, n.2-3, p.91-98, 2000.
- MARÍN-LEÓN, L.; OLIVEIRA, H.D.; BOTEAGA, N.J. Mortalidade por dependência de álcool no Brasil: 1998-2002. **Psicologia em estudo**, v.12, n.1, p.115-121, jan./abr. 2007.
- MELO-JÚNIOR, M.R.; PATU, V.J.R.M.; ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; COSTA-SILVA, R.B.; PONTES-FILHO, N.T. Efeitos da desnutrição e consumo crônico de etanol sobre o perfil histológico do pâncreas de ratos recém-natos. **Revista Paraense de Medicina**, v.21, n. 4, p.23-29, 2007.
- MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26. (Supl.I) p.7-10, 2004.
- MENDENHALL, C.L.; THEUS, S.A.; ROSELLE, G.A.; GROSSAMN, C.J.; ROUSTER, S.D. Biphasic in vivo immune function after low-versus high-dose alcohol consumption. **Alcohol**, v.14, n.3, p.255-260, 1997.
- MENELLA, J. A.; BEAUCHAMP, K. Effects of beer on breast-fed. **Journal of the American Medical Association**, v. 269, p. 1637-1668,1993.
- MENELLA, J. Alcohols effect on lactation. **Alcohol Research Health**, v.25, p.230-234, 2001.
- MENELLA, J.A.; GUERRISH, C.J. Short-term effects of maternal alcohol consumption on lactational performance. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, p. 1389-1391, 1998.
- MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V.B.V. Instalações e equipamentos. In: COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo:EPM, 1996. p. 15-25.
- MINCIS, M. Doença hepática alcoólica: diagnóstico e tratamento. **Diagnóstico e Tratamento**, v.9, p. 52-60, 2004.
- MITCHELL, M.C.; HERLONG, H.F. Alcohol and nutrition: caloric value, bioenergetics and relationship to liver damage. *Annual Review of Nutrition*, v.6, p. 457-474, 1986.
- MONTEIRO, C.A; SZARFRAC, S.C.; MONDINI, L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n.6, p. 91-101, 2000.
- MONTEIRO, M.G. Alcohol research in Latin América. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.20, p.176A-180A, 1996.

- MORAES, C.L.; REICHENHEIM, M.E. Rastreamento de uso de álcool por gestantes de serviços públicos de saúde do Rio de Janeiro. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n.5, p. 695-703, 2007.
- MURILLO-FUENTES, M.L.; ARTILLO, R.; OJEDA, M.L.; DELGADO, M.J.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Effects of prenatal or postnatal ethanol consumption on zinc intestinal absorption and excretion in rats. **Alcohol & Alcoholism**, v.42, n.1, p.3-10, 2007.
- MURILLO-FUENTES, M.L.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Effects of maternal ethanol consumption during pregnancy or lactation on intestinal absorption of folic acid in suckling rats. **Life Science**, v. 73, p.2199-2209, 2003.
- NETO, M.T. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. **Acta Pediatrica Portuguesa**, v. 1, n.37, p. 23-26, 2006.
- NÓBREGA, M.P.S.S.; OLIVEIRA, E.M. Mulheres usuárias de álcool: análise qualitativa. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n.5, p.816-823, 2005.
- NOVAES, C.; MELO, N.R.; BRONSTEIN, M.D.; ZILBERMAN, M.L. Impacto do alcoolismo em mulheres: repercussões clínicas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.27, n.1, p. 16-21, 2000.
- NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.; SILVA, G.O.; BORBA, L.M. Colostro humano: fonte natural de probióticos? **Jornal de Pediatria**, v. 77, n.4, p.265-270, 2001.
- ODDY, W.H. Breastfeeding protects against illness and infection in infants and children: a review of the evidence. **Breastfeeding Review: Professional Publication of the Nursing Mother's Association of Australia**, v.9, n.2, p.8-11, 2001.
- OJEDA, M.L.; VAZQUEZ, B.; NOGALES, F.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Ethanol consumption by Wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny. **International Journal of Environment Research and Public Health**. v.6, p.2139-2149, 2009.
- ONIS, M.; GARZA, Z.; VICTORA, C.G.; BHAN, M.K.; NORUM, K.R. The WHO Multicentre Growth Reference Study (MGRS): rationale, planning, and implementation. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 25, n.1, (Supl. 1) 2004.
- ONIS, M.; ONYANGO, A.W.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v.85, n.9, p.660-667, 2007.
- ORANGE, L.G.; BION, F.M.; LIMA, C.R. Effects of different concentrations of sugarcane alcohol on food intake and nutritional status of male and female periadolescent rats. **Alcohol**, v. 43, p. 137-146, 2009.

- ORTIGÃO-DE-SAMPAIO, M.B.; CASTELLO-BRANCO, L.R.R. Imaturidade imunológica fetal e neonatal: implicações na evolução clínica da infecção pelo HIV-1 em crianças. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n.1, p. 29-34, 1997.
- OYAMA, L.M.; COUTO, R.C.; COUTO, G.E.C.; DAMASO, A.R.; OLLER-DO-NASCIMENTO, C.M. Ethanol intake during lactation I. Effects on dams metabolism and pups body weight gain. *Alcohol*, v. 21, p.195-200, 2000.
- PALA, B. Il consumo alcolico femminile tra ricerca di parità e aumento del rischio: quale prevenzione ? *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, v. 40, n.1, p.41-46, 2004.
- PASSINI-JUNIOR, R. Alcohol consumption during pregnancy. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.27, n. 7, p.373-375, 2005.
- PEARL, R. *Alcohol and longevity*. New York: Knopf, 1926.
- PERCIVAL, S.S.; SIMS, C.A. Wine modifies the effects of alcohol on immune cells of mice. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 5, p. 1091-1094, 2000.
- PETZ, L.D. Hematologic aspects of liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 5, n.3, p. 372-377, 1989.
- RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, v.356, p. 233-241, 2000.
- RAYNÉRIO- COSTA, M.; MARREIRO, D.N. Aspectos metabólicos e funcionais do zinco na síndrome de Down. *Revista de Nutrição*, v.19, p.501-510, 2006.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-1993. Purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76^A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, n.10, p. 1939-1951, 1993.
- REIS, N.T.; RODRIGUES, C.S.C. *Nutrição clínica no alcoolismo*. Rio de Janeiro. Ed. Rubio, 2003.
- REITMAN, S.; FRANKEL, A. S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic, oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 28, n. 56, p. 56-63, 1957.
- ROMEO, J.; WARNBERG, J.; NOVA, E.; DÍAZ, L.E.; GÓMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Moderate alcohol consumption and the immune system: A review. *British Journal of Nutrition*, v. 98 (Suppl 1) p. s11-115, 2007a.
- _____. Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v. 51, p. 359–366, 2007b.
- _____. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 63, p.153–160, 2007c.

ROOM, R.; BABOR, T.; REHM, J. Alcohol and public health. **Lancet**, v. 365, n. 9458, p.519-530, 2005.

SANDRE-PEREIRA, G.; COLARES, L.G.T.; TAVARES-DO-CARMO, M.G.; SOARES, E.A. Conhecimentos maternos sobre amamentação entre puérperas inscritas em programas de pré-natal. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.2, p.457-466, 2000.

SARIN, S.K.; DHINGRA, N.; BANSAL, A.; MALHOTRA, S.; GUPTAN, R.C. Dietary and nutritional abnormalities in alcoholic liver disease: a comparison with chronic alcoholics without liver disease. **American Journal of Gastroenterol**, v. 92, p.777, 1997.

SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **The Journal of Nutrition**, v.133, n.1, p.316S-321S, 2003.

SEELIG-Jr., L.L.; STEVEN, W.M.; STEWART, G.L. Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to *Trichinella Spiralis* in female rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 34, n.4, p.520-528, 1999.

SENA, K.C.; PEDROSA, L.F. Zinc supplementation and its effects on growth, immune system, and diabetes. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.18, p.251-259, 2005.

SJOGREN, H.; ERIKSSON, A.; BROSTROM, G.; AHIM, K. Quantification of alcohol-related mortality in Sweden. **Alcohol and Alcoholism**, v.35, n.6, p. 601-611, 2000.

SILVA, L.S.V.; THIAPO, A.P.; SOUZA, G.G.; SAUNDERS, C.; RAMALHO, A. Micronutrientes na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v. 7, n.3, p. 237-244, 2007.

SILVA, D.R.N.; SCHNEIDER, A. P.; STEIN, R.T. O papel do aleitamento materno no desenvolvimento de alergias respiratórias. **Scientia Medica**, v. 19, p.35-42, 2009.

SIMÃO, M.O.; KERR-CORRÊA, F.; DALBENAND, I.; SAMAIRA, S.I. Mulheres e homens alcoolistas: um estudo comparativo de fatores sociais, familiares e de evolução. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n.3, p.121-129, 2002.

SINGH, M. Role of micronutrients for physical growth and mental development. **Indian Journal of Pediatrics**, v.71, p.59-62, 2004.

SMITH, D.W.; TRUOQ, W.; ROGERS, J.E.; GREITZER, L.J.; SKINNER, A.L.; MCCANN, J.J.; HARVEY, M.A. Shifting linear growth during infancy: illustration of genetic factors in growth from fetal life through infancy. **The Journal of Pediatrics**, v. 89, n. 2, p.225-230, 1976.

SOUZA, M.D.C.A.; HARDT, P.P. Evolucao dos habitos alimentares no Brasil. **Brasil Alimentos**, n.15. p. 32-39, 2002.

SPENCER, H.; RUBIO, E.; INDREIKA, M.; SEITAM, A. Chronic alcoholism. Frequently overlooked cause of osteoporosis in men. **The American Journal of Medicine**, v.80, n.3, p.393-397, 1986.

STREISSGUTH, A.P.; LANDESMAN-DWYER, S.; MARTIN, J.C.; SMITH, D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. **Science**, v. 209, p.353-361, 1980.

SUBRAMANIAN, M.G. Prolactin secretion in lactating rats following chronic alcohol exposure-provocative tests with secretagogues. **Life Science**, v. 57, p. 533-539, 1995.

SUTER, P.M. Is alcohol consumption a risk factor for weight gain and obesity? **Criticals Reviews in Clinical Laboratory Science**, v. 42, n.3, p. 197-227, 2005.

SUTER, P.M.; HASLER, E.; VETTER, W. Effects of alcohol on energy metabolism and body weight regulation: is alcohol a risk factor for obesity? **Nutrition Reviews**, v.55, n.5, p. 157-171, 1997.

SUZANNE, C. Sistema endocrino. In: BRUNNER; SUDDARTH. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgico**. 7a ed., 1992.

SZABO, G. Monocytes, alcohol use, and altered immunity. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 22, n.5, p. 216s-219s, 1998.

_____. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol and Alcoholism**, v.34, n. 6, p. 830-841, 1999.

Tabela Brasileira de composição de alimento / NEPA-UNICAMP. 2. ed. (Campinas :SP: NEPA-UNICAMP) 113p.

TAVARES, E.; CARRERAS, O.; GÓMES, T.A; PAGLIALI, H.; MURILLO, M.L. Zinc intestinal absorption in newborn rats at 21 day postpartum: effects of maternal ethanol consumption. **Life Science**, v.62, p.787-797, 1998.

TAVARES-DO-CARMO, M.G.; NEVES, J.;FACCIN, G.L. Efeitos da ingestão de álcool durante a lactação sobre a produção e composição do leite materno e sobre o crescimento da prole: estudo em ratas. **Revista de Nutrição de Campinas**, v. 8, n. 1, p.47-84, 1995.

THAKUR, S.; GUPTA, N.; KAKKAR, P. Serum copper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition. **European Journal of Pediatric**, v.163, p.742-744, 2004.

TOLLARA, M.N.; BENECKER, M.J.S.; CARVALHO, G.D.; CORRÊA, M.S.N.P. Aleitamento natural. In: CORRÊA, M.S.N.P. **Odontopediatria na 1ª infância**. São Paulo: Santos, 2005. p.83-98.

VASCONCELOS, F.A.G. Tendências históricas dos estudos dietéticos no Brasil. *Historia, ciências, saúde –Manguinhos*, v.14, n.1, 2007.

VEIGA, R.K.A.; MELO-JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; MELLO, L.A.; PONTES-FILHO, N.T. Alterações morfológicas no timo, baço e placas de Peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.1, p.32-42, 2007.

VENEGAS, S.V. et al. Concentración de inmunoglobulina A secretora (IgAs) en colostro e leche de tercer mes durante lactancia exclusiva. Resúmenes XIX Congreso Pediátrico. **Revista Chilena de Pediatría** (Supl, esp. 63), p. 66, 1992.

VICTORA, C.G.; MORRIS, S.S.; BARROS, F.C.; DE ONIS, M.; YIP, R. The NCHS reference and the growth of breast and bottle-fed infants. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1134-1138, 1998.

VIEIRA, G.O.; SILVA, L.R.; VIEIRA, T.O. Alimentação infantil e morbidade por diarreia. **Jornal de Pediatría**, v. 79, n.5, p.449-454, 2003.

VILALPANDO, S. Ethanol consumption during pregnancy and lactation: changes in the nutritional status of predominantly breast feeding mothers. **Archives of Medical Research**, v. 24, p. 333-338, 1993.

VINAGRE, R.D.; DINIZ, E.M.A. Análise crítica do uso de leite humano procedente de Banco de Leite Humano na alimentação recém-nascido prematuro. 1999. **Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo**, 1999.

VITOLO, M.R.; PATIN, R.B.; VON BULOW, A. C.; GANZERLI, N.; FISBERG, M. Conhecimentos e crenças populares de puérperas na prática da amamentação. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v. 7, p. 132-147, 1994.

WAGNER, C.L. Amniotic fluid and human milk: a continuum of effect? **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.34, n. 5, p.513-514, 2002.

WHO. Estimativa das necessidades de energia e proteína de adultos e crianças. **Necessidades de energia e proteínas**. São Paulo: Roca, 1998. p.152. (Série de Relatos Técnicos, 724).

WHO. The World Health Organization's infant-feeding recommendation. **Bulletin of the World Health Organization**, v.73, p. 165-174, 1995.

WILBORN, C.D. et al. Effects of zinc magnesium aspartate (ZMA) supplementation on training adaptations and markers of anabolism and catabolism. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.1, n.2, p.12-20, 2004.

WILSNACK, R.W.; VOGELTANZ, N.D.; WILSNACK, S.C.; HARRIS, T.R. Gender differences in alcohol consumption and adverse drinking consequences: cross-cultural patterns. **Addiction**, v. 95, n.2, p.251-265, 2000.

WINTERGERST, E.S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D.H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n.4, p.301-323, 2007.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biology of the Neonate**, v. 74, p.121-133, 1998.

ZHU, X.; SEELIG, L.L. Developmental aspects of intestinal intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the rat following placental and lactational exposure to ethanol. **Alcohol and Alcoholism** , v.35, n.1, p.25-30, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Sbrana, s/n
 50740-470 - Recife - PE - Brasil
 Telefone: (51) 3446-6000 / 3446-6002
 Fax: (51) 3446-6000
 www.ufpe.br



Recife, 12 de maio de 2009

Ofício nº 144/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
 Para: Profª Célia Maria Machado Barbosa de Castro
 Departamento de Nutrição – CCS
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.004070/2009 - 03

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Alcoolismo na lactação: Repercussões metabólicas e imunológicas na prole”*.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

CEEA Prof.ª Maria Teresa Jensen
 Presidente do CEEA

Observação: Aluna do doutorado: Luciana Gonçalves de Orange
 Origem dos animais: Biotério do Departamento Nutrição
 Animais: Ratos Wistar, Sexo: machos e fêmeas; Ratas lactantes e recém-nascidos; Número de animais previsto no protocolo: 168 animais

ANEXO B – Documentação de submissão do artigo I

Alcohol Submission Confirmation

De: **ees.alcohol.0.10c37e.ab2a3b87@eesmail.elsevier.com** em nome de **Alcohol - An International Biomedical Journal** (alcojml@iupui.edu) 

Enviada: quarta-feira, 27 de abril de 2011 11:06:50

Para: luciana_orange@hotmail.com

Title: Immune response in newborn rats exposed to sugarcane alcohol associated to an experimental diet

Corresponding Author: Luciana Luciana Gonçalves Orange

Authors: Francisca M Bion, PhD; Cybelle R Lima, PhD; Nicodemos T Pontes-Filho, PhD; Sidcley B Araujo, Ms; Danielle Oliveira, Student; Ana Paula B Alves, Student; Midori C Sugaya, Student; Celia Maria M Barbosa de Castro, PhD

Dear Luciana Orange,

We have received your manuscript titled "Immune response in newborn rats exposed to sugarcane alcohol associated to an experimental diet". Your manuscript will be given a number shortly, and you will soon receive an e-mail with this number for your reference. You will be able to check on the progress of your manuscript by logging onto the Elsevier Editorial System for Alcohol as an author:

<http://ees.elsevier.com/alcohol/>

Your username is: luciana_orange

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/alcohol/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to Alcohol - An International Biomedical Journal.

Sincerely yours,

Charles R. Goodlett, PhD
Editor-in-Chief, Alcohol
Department of Psychology
IUPUI
402 North Blackford Street
Indianapolis, IN 46202-3275
USA

ANEXO C – Normas para publicação na revista *Alcohol*

ANEXO D- Documentação de submissão do artigo II

[Rev Paul Pediatr] Agradecimento pela Submissão

De: **Paloma** (suporte.aplicacao@scielo.org)
Enviada: sexta-feira, 29 de abril de 2011 4:47:03
Para: Luciana Goncalves Orange (luciana_orange@hotmail.com)

Luciana Goncalves Orange,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Efeitos nutricionais e metabólicos em lactentes expostos a ingestão materna de aguardente associada a uma dieta experimental: estudo em ratos" para Revista Paulista de Pediatria. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/rpp/author/submission/56822>

Login: luciana_orange

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Paloma
Revista Paulista de Pediatria

Revista Paulista de Pediatria
<http://submission.scielo.br/index.php/rpp>

ANEXO E- Normas para publicação na Revista Paulista de Pediatria

Normas para publicação

ORIENTAÇÃO PARA O PREPARO DO MANUSCRITO

NORMAS GERAIS

O artigo deverá ser diagramado em papel A4 (210x297mm), com todas as margens de 25 mm, espaço duplo em todas as seções. Empregar fonte Times New Roman tamanho 11, páginas numeradas no canto superior direito (começar pela página de rosto) e processador de textos Microsoft Word. Os manuscritos deverão conter, no máximo:

1. Artigos originais: 3000 palavras (sem incluir: página de rosto, resumo, abstract, tabelas, gráficos, figuras e referências bibliográficas) e 30 referências.
2. Revisões: 3500 palavras (sem incluir: página de rosto, resumo, abstract, tabelas, gráficos, figuras e referências bibliográficas) e 55 referências.
3. Relatos de casos: 2000 palavras (sem incluir: página de rosto, resumo, abstract, tabelas, gráficos, figuras e referências bibliográficas) e 25 referências.

É obrigatório anexar carta de submissão assinada por todos os autores. Nessa carta, os autores devem referir que o artigo é original, nunca foi publicado e não foi ou não será enviado a outra revista enquanto sua publicação estiver sendo considerada pela Revista Paulista de Pediatria. Além disto, deve ser declarado na carta que todos os autores participaram da concepção do projeto e/ou análise dos dados obtidos e/ou da redação final do artigo e que todos concordam com a versão enviada para a publicação. Os autores devem declarar qualquer conflito de interesse ou citar que não foram omitidas informações a respeito de financiamentos para a pesquisa ou de ligação com pessoas ou companhias que possam ter interesse nos dados abordados pelo artigo.

Transferência de direitos autorais: no momento da aceitação do manuscrito para publicação na Revista Paulista de Pediatria, todos os autores devem assinar formulário [Transferência de Direitos Autorais](#), no qual os autores reconhecem que, a partir desse momento, a Associação de Pediatria de São Paulo passa a ser detentora dos direitos autorais do manuscrito. O artigo só será publicado após a chegada à secretaria editorial da Revista desse formulário com as assinaturas de todos os autores.

Para artigos originais, anexar uma cópia da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde foi realizada a pesquisa. A Revista Paulista de Pediatria adota a [Resolução 196/96](#) do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que aprovou as “Novas Diretrizes e Normas Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos” (DOU 1996 Out 16; no201, seção 1:21082-21085). Somente serão aceitos os trabalhos elaborados de acordo com estas normas. Para relato de casos também é necessário enviar a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e, se houver possibilidade de identificação do paciente, enviar cópia do consentimento do responsável para divulgação científica do caso clínico. Para revisões da literatura, não há necessidade desta aprovação.

A Revista Paulista de Pediatria não se responsabiliza pelo eventual extravio dos originais. Os autores devem ter consigo uma cópia do manuscrito original, enquanto o artigo estiver sendo

considerado para a publicação pela Revista.

NORMAS DETALHADAS

O conteúdo completo do artigo original deve obedecer aos “Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas”, publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas - [International Committee of Medical Journal Editors](#). Cada uma das seguintes seções deve ser iniciada em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras-chave em português; *abstract e key-words*; texto; agradecimentos e referências bibliográficas. As tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos e colocadas ao final do texto. Cada tabela e/ou figura deve conter o título e as notas de rodapé. Cada tabela e/ou figura deverá estar em uma página separada.

Página de rosto:

Formatar com os seguintes itens:

1. Título do artigo em português (evitar abreviaturas)
2. Título do artigo em inglês
3. Nome COMPLETO de cada um dos autores acompanhado de titulação mais importante de cada autor e a instituição de ensino, pesquisa ou assistência à qual pertence.
4. Autor correspondente: definir o autor correspondente e colocar endereço completo (endereço com CEP, telefone, fax e obrigatoriamente endereço eletrônico).
5. Instituição: declarar a instituição de ensino, pesquisa ou assistência na qual o trabalho foi realizado.
6. Declaração de conflito de interesse: descrever qualquer ligação de qualquer um dos autores com empresas e companhias que possam ter qualquer interesse na divulgação do manuscrito submetido à publicação. Se não houver nenhum conflito de interesse, escrever “nada a declarar”.
7. Fonte financiadora do projeto: descrever se o trabalho recebeu apoio financeiro, qual a fonte (por extenso) e o número do processo.
8. Número total de palavras: no texto (excluir página de rosto, resumo, abstract, agradecimento, referências, tabelas, gráficos e figuras), no resumo e no abstract. Colocar também o número total de tabelas, gráficos e figuras e o número de referências.

Resumo e Abstract:

Cada um deve ter, no máximo, 250 palavras. Não usar abreviaturas. Eles devem ser estruturados de acordo com as seguintes orientações:

1. Resumo de artigo original: deve conter as seções Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões (Abstract: Objective, Methods, Results and Conclusions).
2. Resumo de artigos de revisão: deve conter as seções Objetivo, Fontes de dados, Síntese dos dados e Conclusões (Abstract: Objective, Data source, Data synthesis and Conclusions).
3. Resumo de relato de casos: deve conter as seções: Objetivo, Descrição do caso e Comentários (Abstract: Objective, Case description and Comments).

Para o abstract, é importante obedecer às regras gramaticais da língua inglesa. Deve ser feito por alguém fluente em inglês.

Palavras-chave e key-words:

Fornecer, abaixo do resumo em português e inglês, 3 a 6 descritores, que auxiliarão a inclusão adequada do resumo nos bancos de dados bibliográficos. Empregar exclusivamente descritores da lista de [Descritores em Ciências da Saúde](#) elaborada pela BIREME. Esta lista mostra os termos correspondentes em português e inglês.

Texto:

Artigo original: dividido em introdução (sucinta com 4 a 6 parágrafos, apenas para justificar o trabalho e contendo no final os objetivos); método (especificar o delineamento do estudo, descrever a população estudada e os métodos de seleção, definir os procedimentos empregados, detalhar o método estatístico. É obrigatória a declaração da aprovação dos procedimentos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição); resultados (claros e objetivos – o autor não deve repetir as informações contidas em tabelas e gráficos no corpo de texto); discussão (interpretar os resultados e comparar com os dados de literatura, enfatizando os aspectos importantes do estudo e suas implicações, bem como as suas limitações - finalizar esta seção com as conclusões pertinentes aos objetivos do estudo).

Artigos de revisão: não obedecem a um esquema rígido de seções, mas sugere-se que tenham uma introdução para enfatizar a importância do tema, a revisão propriamente dita, seguida por comentários e, quando pertinente, por recomendações.

Relatos de casos: divididos em introdução (sucinta com 3 a 5 parágrafos, para ressaltar o que é conhecido da doença ou do procedimento em questão); descrição do caso propriamente dito (não colocar dados que possam identificar o paciente) e discussão (na qual é feita a comparação com outros casos da literatura e a perspectiva inovadora ou relevante do caso em questão).

Agradecimentos:

Agradecer de forma sucinta a pessoas ou instituições que contribuíram para o estudo, mas que não são autores.

Referências Bibliográficas:**No corpo do texto:**

Devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem de aparecimento no texto. As referências no corpo do texto devem ser identificadas por algarismos arábicos entre parênteses sobrescritos.

No final do texto (lista de referências):

As referências devem seguir o estilo preconizado no [International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements](#), conforme os exemplos a seguir.

1. Artigos em Periódicos**Até 6 autores: listar todos os autores:**

Jih WK, Lett SM, des Vignes FN, Garrison KM, Sipe PL, Marchant CD. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *Infect Dis* 2000;182:1409-16.

Mais do que 6 autores:

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK *et al*. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res*

2002;935:40-6.

Grupos de Pesquisa:

a. *Sem autor definido:*

Diabetes Prevention Program Research Group. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 2002;40:679-86.

b. *Com autor definido:*

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ; Alf-One Study Group. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2003;169:2257-61.

Sem autores:

Autoria não referida. 21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ* 2002;325:184.

Volume com suplemento:

Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002;42 Suppl 2:S93-9.

Artigo publicado eletronicamente, antes da versão impressa:

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood*; Epub 2002 Jul 5.

Artigos aceitos para a publicação ainda no prelo:

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M. Signature of balancing selection in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. In press 2002.

Artigos em Português:

seguir o estilo acima, na língua portuguesa.

2. Livros e Outras Monografias

Livros:

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

Obs: se 1a edição, não é necessário citar a edição.

Capítulos de livros:

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Obs: se 1a edição, não é necessário citar a edição.

Conferência publicada em anais de Congressos:

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. *Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming*; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. p. 182-91.

Resumos publicados em anais de Congressos:

Blank D, Grassi PR, Schlindwein RS, Melo JL, Eckhert GE. The growing threat of injury and

violence against youths in southern Brazil: a ten year analysis. Abstracts of the Second World Conference on Injury Control; 1993 May 20-23; Atlanta, USA. p. 137-8.

Teses de mestrado ou doutorado:

Afiune JY. Avaliação ecocardiográfica evolutiva de recém-nascidos pré-termo, do nascimento até o termo [tese de mestrado]. São Paulo (SP): USP; 2000.

3. Outros materiais publicados

Artigos em Jornais, boletins e outros meios de divulgação escrita:

Tynan T. Medical improvements lower homicide rate: study sees drop in assault rate. The Washington Post 2002 Aug 12. p. 1.

Leis, portarias e recomendações:

Brasil - Ministério da Saúde. Recursos humanos e material mínimo para assistência ao RN na sala de parto. Portaria SAS/MS 96, 1994.

Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde - área técnica de saúde da mulher. Parto, aborto e puerpério: assistência humanizada à mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

Obs: se o material for disponível na internet, colocar Disponível em: [http://www....](http://www...)

4. Material Eletrônico

Artigo de Periódico Eletrônico:

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002;102(6) [cited 2002 Aug 12]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografia na Internet ou Livro Eletrônico:

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site:

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage ou de um site:

American Medical Association [homepage on the Internet]. AMA Office of Group Practice Liaison [cited 2002 Aug 12]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Brasil - Ministério da Saúde – DATASUS [homepage na Internet]. Informações de Saúde-Estatísticas Vitais- Mortalidade e Nascidos Vivos: nascidos vivos desde 1994 [citado em Fevereiro 10, 2007]. Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>

Observação: Comunicações pessoais não devem ser citadas como referências.

Tabelas:

Cada tabela deve estar em folha separada, numerada na ordem de aparecimento no texto e conter um título. As explicações devem estar no rodapé da tabela e não no título. Não usar qualquer espaço do lado do símbolo ±. Digitar as tabelas no processador de textos Word,

usando linhas e colunas – não separar colunas como marcas de tabulação. Não importar tabelas do Excel ou do Powerpoint.

Gráficos:

Numerar os gráficos de acordo com a ordem de aparecimento no texto e colocar um título abaixo do mesmo. Os gráficos devem ser sempre em duas dimensões, em branco/preto (não usar cores) e feitos em PowerPoint. Mandar em arquivo ppt separado do texto: não importar os gráficos para o texto. A Revista Paulista de Pediatria não aceita gráficos escaneados.

Figuras:

Devem ser numeradas na ordem de aparecimento do texto. As explicações devem constar da legenda (mandar legenda junto com o arquivo de texto do manuscrito, em página separada). Figuras reproduzidas de outras fontes devem indicar esta condição na legenda e ter a permissão por escrita da fonte para sua reprodução. A obtenção da permissão para reprodução das imagens é de inteira responsabilidade do autor. Para fotos de pacientes, estas não devem permitir a identificação do indivíduo – caso exista a possibilidade de identificação, é obrigatória carta de consentimento assinada pelo indivíduo fotografado ou de seu responsável, liberando a divulgação do material. **Imagens geradas em computador devem ser anexadas nos formatos .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi, em arquivo separado (não importar para o texto)**. Pode-se também enviar a figura em papel e, nesse caso, a Revista Paulista de Pediatria não se responsabiliza pelo eventual extravio, devendo o autor manter em seu arquivo o original da figura. A Revista Paulista de Pediatria não aceita figuras escaneadas.

SUBMISSÃO ON LINE

SÓ SERÃO ACEITAS SUBMISSÕES DE ARTIGOS ATRAVÉS DO SISTEMA ON LINE

Para submissão acessar link abaixo e seguir passos do processo:

<http://submission.scielo.br/index.php/rpp/index>

1. Fazer o cadastro no sistema <http://submission.scielo.br/index.php/rpp/index>, clicar em Cadastro (Register).
2. Preenchimento do perfil: preencher perfil com informações gerais e institucionais. No final do cadastro será aberta página principal de submissão. Caso queira submeter o artigo posteriormente, é possível entrar no sistema a qualquer momento com o seu login e senha cadastrados.
3. Passos de submissão:
 - a. O autor deve clicar em todos os itens que descrevem as condições da revista para as submissões de artigos, bem como de direitos autorais, escolha da seção do periódico e carta de apresentação aos editores. Somente após o preenchimento de todos os campos será possível seguir com a submissão. Clicar em “Salvar e continuar”.
 - b. Nesta etapa, serão cadastrados os dados do autor principal e co-autores, sendo possível a escolha do autor de correspondência. Também nessa etapa são cadastradas informações de título, resumo e palavras-chave (indexação). Após o preenchimento de todos os campos, clicar em “Salvar e continuar”.
 - c. Transferência do arquivo para submissão. O autor deve selecionar o arquivo por meio do browse e clicar em transferir. Após a transferência, clicar em “Salvar e continuar”.

- d. Transferência de Documentos Suplementares: Os documentos suplementares são os anexos, imagens, tabelas, figuras e gráficos que fazem parte da submissão e que serão apresentados juntamente com o artigo para o editor. O autor pode anexar qualquer quantidade de arquivos. Após a transferência dos arquivos, salvar e continuar. Logo em seguida o sistema disponibiliza uma tela de preenchimento de metadados do arquivo transferido. Neste item, preencher os títulos, palavras-chaves e descrição geral do documento. Os metadados devem ser preenchidos individualmente para cada documento transferido. Neste momento também é possível substituir artigos suplementares enviados anteriormente. Este processo pode ser repetido de acordo com a quantidade de arquivos suplementares que o autor deseja submeter. Depois de finalizado o processo, clicar em “Salvar e continuar”, com limite de 4 MB.
- e. Confirmar a submissão: o autor deve verificar os arquivos e clicar em “Concluir Submissão”. Nesta etapa o autor tem acesso a suas submissões ativas dentro do sistema, bem como ao andamento delas dentro do periódico escolhido.
- f. Submissão de artigos: após realização do cadastro como autor no sistema, sempre que quiser acessar o processo para uma nova submissão, basta acessar a página e inserir login e senha.

Normas de Publicação atualizadas e divulgadas em 30 de junho de 2009.