

MARIANA LÚCIA CORREIA RAMOS COSTA

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ÁLCOOL-DESNUTRIÇÃO
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PERINATAL DO CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS

RECIFE

2010

Mariana Lúcia Correia Ramos Costa

Efeitos da associação álcool-desnutrição durante o desenvolvimento
perinatal do córtex cerebral de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

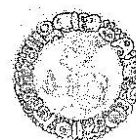
ORIENTADOR: Nicodemos Teles de Pontes Filho

Recife
2010



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia**

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap.ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



***DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.***

AUTORA: *MARILANA LÚCIA CORREIA RAMOS COSTA*

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: *PATOLOGIA*

**NOME DA DISSERTAÇÃO: *"EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ÁLCOOL-DESNUTRIÇÃO
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PERINATAL DO CÓRTEX CEREBRAL DE
RATOS".***

ORIENTADOR: *PROF. DR. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO*

DATA: *11 DE FEVEREIRO DE 2010.*

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

Prof.ª Pós - Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Dedico esta conquista acadêmica às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais (Eliezer e Ritinha) e minhas irmãs (Débora e Cecília) exemplos de determinação, persistência e caráter. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês são meus eternos laços de amor e cumplicidade. Obrigada por tudo!!

Agradecimentos

A Deus, meu grande amigo que procuro buscar em todos os momentos desta minha caminhada, que tem me ensinado a cultivar a paciência, o amor, a resignação e a perseverança. Sou grata a Ti por mais essa conquista.

Aos meus pais, Eliezer e Ritinha pelo exemplo de honestidade, compreensão, cumplicidade, perseverança, amor e acima de tudo pela confiança que me foi ofertada para a conquista de mais uma etapa acadêmica, meus eternos agradecimentos. Obrigada!!! Amo vocês!!!

À minha irmã Débora, por ter sido pra mim, o exemplo mais próximo e inicial de vida acadêmica, você foi meu ponto de partida e continua, mesmo que distante, sendo meu espelho. Te amo.

À minha irmã Cecília, pelo apoio, estímulo e exemplo de profissionalismo que lhe é peculiar. Te amo.

Aos meus familiares, em especial a Tia Carminha, pelo incentivo, Tia Nênen,, pelo “auxílio moradia” nos dias de UFPE e ao meu avô Nelson Costa (in memorian) pelos ensinamentos.

Ao meu querido amigo e orientador Profº Drº Nicodemos Teles de Pontes Filho, pela brilhante demonstração do que é ser Educador, Orientador, Pesquisador e amigo com zelo, amor e acima de tudo paciência. Exemplo que procurarei seguir. Serei eternamente grata!!!

Aos professores do programa de Pós-graduação em Patologia, em especial, Profº Drº Hilton Justino pelos ensinamentos técnicos na elaboração desta dissertação, ao Profº Drº Mário Ribeiro e ao Profº Drº Roberto Vieira pela contribuição técnica e científica.

Aos meus amigos de mestrado, pelos bons e maus momentos compartilhados, em especial aos que dividiram comigo as angústias das incertezas. Ao meu amigo Carlos Weber pelo apoio incondicional e a ao meu amigo e André pelas palavras incentivadoras e apoio diante das dificuldades no laboratório de patologia. Obrigada a todos pela amizade, os guardarei para sempre.

As minhas amigas de longas datas, em especial a Paulinha, Renas e Lu, por tudo, principalmente pela compreensão nas ausências. O que seria de mim sem vocês! Amo todas.

Aos funcionários da secretaria do mestrado, Taty, Dona Mari e Sônia pela paciência e pelos cafezinhos das manhãs.

À FACEPE pelo financiamento da pesquisa.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho.

“Só é verdadeiramente grande aquele que, considerando a vida como uma viagem que deve conduzi-lo a um objetivo, faz pouco caso das asperezas do caminho e não se deixa jamais desviar um instante do caminho reto; o olhar sem cessar dirigido para o objetivo, pouco lhe importa que as sarças e espinhos da senda lhe ameacem atingi-lo, e, por isso, não prossegue menos o seu curso.”

Allan Kardec

Resumo

Sabe-se que o etanol e a desnutrição podem produzir vários efeitos no Sistema Nervoso Central, tais como, microcefalia, deficiência mental, disfunção motora e deficiências cognitivas, no entanto, os mecanismos que induzem estas alterações permanecem desconhecidos ou pouco entendidos. Baseando-se nessas informações, o presente estudo avaliou os efeitos do etanol e desnutrição sobre a área e perímetro do soma, o número e a extensão dos prolongamentos primários dos neurônios NADPH-diaforase, bem como a densidade neuronal nas camadas corticais do córtex visual através de parâmetros morfométricos. Para tanto, estudou-se o córtex visual de ratos machos Wistar, com 40 dias de idade, gerados e amamentados por matrizes submetidas à dieta multicarencial (8% de proteína) e à administração de álcool (Aguardente comercial ou Etanol PA). Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais conforme o tratamento (N, D, AN, AD, EN e ED). Os cortes histológicos encefálicos foram corados pelo método Cresil Violeta - coloração de Nissl - e pelo método indireto da enzima málica para a marcação histoquímica das células NADPH-diaforase. Houve modificação nos padrões morfológicos do córtex visual de ratos, observando-se que: a) a desnutrição não influenciou a densidade neuronal, porém em relação aos neurônios NADPH-diaforase, encontrou-se redução na densidade, área, perímetro, extensão e número dos prolongamentos; b) o tratamento com álcool isoladamente ou associado à desnutrição teve influência sobre a densidade neuronal, bem como na área, perímetro, extensão dos prolongamentos e densidade dos neurônios NADPH-diaforase positivos, porém não influenciou no número de prolongamentos. Concluiu-se que o álcool e a desnutrição, de forma isolada ou em associação, influenciaram o perfil morfológico de neurônios córtex visual durante o desenvolvimento perinatal de ratos jovens.

Descritores: etanol, desnutrição, perinatal, córtex cerebral.

Abstract

It is known that ethanol and malnutrition can produce various effects in the Central Nervous System, such as microcephaly, mental retardation, motor dysfunction and cognitive impairment, however, the mechanisms that induce these changes are still remain unknown or little understood. Based in these reports, the present study evaluated through morphometrics parameters the malnutrition and ethanol effects over the area and perimeter of the cell body, the number and length of the primary extensions of NADPH-diaphorase and the neuronal density in cortical layers of the visual cortex. For both, it was studied the visual cortex zone of Wistar male rats, with 40 days age, generated and suckled by dams submitted to multicarencial dietary (8% protein) and alcohol administration (commercial aguardente or Ethanol PA). The animals were distributed in six experimental groups according to the treatment (N, D, AN, AD, EN e ED). The brain histological slices were stained by Nissl and processed for NADPH-d histochemistry methods. It was showed morphological pattern modifications of rats cerebral cortex; observing that: a) the malnutrition doesn't influenced the neuronal density, but reduced the NADPH-diaforase neurons extensions density, area, perimeter, length and number; b) the isolated or malnutrition associated alcohol treatment influenced on neuronal density as well as, the NADPH-diaforase neurons extensions density, area, perimeter and length, but it didn't influence the length number. Concluded that the alcohol and malnutrition influenced the young rats visual cortex neurons morphological profile during the perinatal development.

Descriptors: ethanol, malnutrition, perinatal, cerebral cortex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura / métodos

- Figura 1** - Esquema da segmentação para obtenção dos fragmentos encefálicos coronais 51
- Figura 2** - Esquema dos planos de microtomia para obtenção dos cortes histológicos coronais 51
- Figura 3** - Fotomicrografia (400x) das células neuronais coradas pelo Cresil Violeta Acético 52
- Figura 4** - Fotomicrografia do corpo celular de um neurônio NADPH-d (400x) 53
- Figura 5** - Fotomicrografia das células neuronais marcadas pela NADPH-d (100x) 55
- Figura 6** - Morfometria da área do soma e dos prolongamentos de um neurônio NADPH-d (400x) 55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo Original

Gráfico 1- Peso encefálico aos 40 dias de vida	77
Gráfico 2- Densidade neuronal de cortes seriados do córtex visual de ratos marcados com Cresil Violeta Acético	77
Gráfico 3- Densidade dos neurônios NADPH-diaforase do córtex visual de ratos	78
Gráfico 4 – Área e Perímetro dos neurônios NADPH-diaforase do córtex visual de ratos	78
Gráfico 5 - Extensão dos prolongamentos dos neurônios NADPH-diaforase	79
Gráfico 6 - Número de prolongamentos primários dos neurônios NADPH-diaforase	79

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
HIPÓTESE	19
OBJETIVOS	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 <u>Formação e desenvolvimento do Sistema Nervoso Central</u>	23
2.2 <u>Álcool</u>	27
2.3 <u>Álcool e o Sistema Nervoso Central</u>	29
2.4 <u>Desnutrição e Dieta Básica Regional</u>	36
2.5 <u>Desnutrição e o SNC</u>	37
2.6 <u>Álcool e Desnutrição</u>	40
2.7 <u>Álcool e Desnutrição no Sistema Nervoso Central</u>	42
2.8 <u>Álcool, desnutrição e produção do Óxido Nítrico (NO) no SNC</u>	43
3. MÉTODOS	47
3.1 <u>Considerações Éticas</u>	47
3.2 <u>Amostras</u>	47
3.3 <u>Protocolo Experimental</u>	47
3.3.1 Animais	47
3.3.2 Acasalamento	47
3.3.3 Grupos Experimentais	48
3.3.4 Determinação do peso encefálico	49
3.3.5 Estudo Morfológico	50
3.3.5.1 Perfusão e Microtomia	50
3.3.5.2 Estudo Histoquímico	52
3.3.6 Análise Microscópica e Morfométrica	54
3.4 Análise Estatística	56

4 RESULTADOS - ARTIGO ORIGINAL	58/59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	95

1 APRESENTAÇÃO

O álcool (etanol) é consumido pelo homem desde os tempos primitivos. Registros arqueológicos revelam os primeiros indícios sobre esse consumo, pelo homem, há aproximadamente 6.000 anos a.C. (USP/CEBRID, 2002), devido à facilidade de sua obtenção a partir da fermentação de frutas (SILVA, 2000). Este uso milenar sugere que o álcool tenha sido a primeira droga relacionada a distúrbios do desenvolvimento fetal (SILVA, 2000).

Os primeiros relatos sobre a fermentação vem dos egípcios antigos. Acreditava-se na cura de várias moléstias, inalando vapor de líquidos aromatizados e fermentados em um ambiente fechado. Os gregos registraram o processo de obtenção da *acqua ardens* - água ardente (*al kuhu*). A cachaça é a denominação exclusiva da aguardente de cana-de-açúcar, uma bebida típica produzida no Brasil, porém conhecida mundialmente. Obtida por destilação da cana-de-açúcar, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius (20 °C), podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro expressos em sacarose (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2003).

O consumo de álcool tem impacto nos diferentes sistemas orgânicos, como, por exemplo, no sistema nervoso central, no trato gastrointestinal, nos órgãos hematopoiéticos e no sistema cardiovascular (SCHOPPET *et al.*, 2001).

Acredita-se que o Sistema Nervoso Central possa ser mais vulnerável que outros órgãos à exposição ao álcool devido a sua alta dependência de um fluxo sanguíneo ininterrupto, ao alto conteúdo de ácidos graxos livres poliinsaturados e o, relativamente baixo nível de enzimas e antioxidantes bloqueadores de radicais livres (ABEL, 1995).

Inicialmente foi dada maior importância aos efeitos estruturais e morfológicos, causados pelas drogas, em seguida verificaram-se evidências de que a função do Sistema Nervoso Central (SNC) poderia ser alterada mesmo na ausência de más formações grosseiras. Posteriormente, surgiram indícios que o álcool etílico ingerido na gravidez causava um padrão de alterações fetais cuja característica mais grave era o retardo mental. Este padrão de alterações foi descrito e denominado por Jones e Smith (1973), Síndrome Alcoólica Fetal (SAF). Sendo a síndrome completa constituída por: distúrbios no Sistema Nervoso Central (SNC), retardo do crescimento pré e/ou pós-natal e dismorfias faciais características (lábio superior fino, ausência de sulco naso-labial, fissuras palpebrais pequenas entre outras).

Desde que a SAF foi descrita como múltiplas anormalidades associadas ao consumo crônico de álcool pela mãe, numerosos trabalhos têm demonstrado que a exposição pré-natal ao álcool afeta o crescimento e o desenvolvimento embrionários (RUDIEN, 1995). Sabe-se que o etanol pode produzir vários efeitos no SNC, tais como, microcefalia, deficiência mental, disfunção motora e deficiências cognitivas (MILLER, 1993). Os mecanismos pelos quais o etanol induz as alterações no SNC, acima descritas, permanecem em estudo.

Despertou-se, desde então, o interesse científico para os riscos que os agentes químicos representavam para o desenvolvimento pré-natal, ressurgindo o interesse no etanol como agente teratogênico, reforçando sobre a vulnerabilidade do conceito a fatores presentes no ambiente da sua mãe e alertando o meio científico para os potenciais efeitos teratogênicos dos agentes químicos ingeridos durante o período de gestação (SILVA, 2000).

Na atualidade, o alcoolismo é considerado um dos maiores problemas de saúde pública, sendo o etanol a droga psicoativa mais utilizada no mundo, com conseqüências graves e muitas vezes irreversíveis para o organismo sadio adulto. A dependência e abuso do etanol é um problema social e suas conseqüências são um problema de saúde pública (HARPER, 2007).

Segundo Schuckit (1995), 90% dos indivíduos que ingerem álcool têm seqüelas decorrentes deste hábito; 40-50% apresentam problemas temporários, enquanto 10% dos homens e 3-5% das mulheres podem desenvolver distúrbios persistentes e generalizados, embora individualmente variáveis, dependendo de fatores ambientais e genéticos.

Pesquisas realizadas na maternidade da cidade de São Paulo que atende a população de baixa renda constataram que 14% das gestantes apresentaram consumo intenso de bebidas alcoólicas durante a gravidez (SILVA *et al.*, 2000). Sendo a exposição ao álcool etílico uma das principais causas conhecidas de retardo mental no mundo ocidental (WEST *et al.*, 1990).

Em estudo desenvolvido na cidade de Ribeirão Preto/SP, Fiorentin (2006) descreveu que 35% das gestantes entrevistadas faziam uso de álcool e que todas o associavam ao tabaco. No mesmo trabalho, o autor concluiu que havia um despreparo formal dessas gestantes durante o pré-natal, em relação aos efeitos deletérios desta droga para o feto em desenvolvimento. As gestantes relataram ter conhecimento dos efeitos maléficos do álcool para o desenvolvimento fetal, sobretudo do cérebro, através do senso comum da população e de experiências vividas, mas não através de informação profissional, despertando a

necessidade de maior atenção, orientação e esclarecimentos sobre os efeitos do álcool e do alcoolismo para a mãe e para o feto.

Por outro lado, quando as anomalias induzidas pelo álcool não estão em conjunto, mas fazem parte da SAF, estas não são de forma alguma específicas e exclusivas desta síndrome sendo comuns, por exemplo, a quadros de desnutrição intra-uterina. Embora a SAF e suas formas menos severas, estejam diretamente relacionadas ao uso crônico do álcool, a sua elevada prevalência em classes sócio-econômicas mais baixas sugere que outros fatores, como a desnutrição, estejam envolvidos (PONTES FILHO, 2003).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que o sistema nervoso é mais afetado no início da vida, sendo a desnutrição um dos fatores que contribuem para o surgimento de danos cerebrais severos (MORGANE *et al.*, 1993).

Alterações nutricionais ocorrem após ingestão em longo prazo e/ou altas doses. O etanol inibe a quebra de nutrientes em moléculas utilizáveis por diminuir a secreção de enzimas digestivas do pâncreas (KORSTEN, 1989) e diminuir a absorção dos mesmos por danificar as células de revestimento do estômago e intestinos, além de impedir o transporte de alguns nutrientes no sangue (FEINMAN, 1989).

Outro importante efeito indireto da ingestão crônica do etanol é a inevitável ação sobre o estado nutricional em alcoolistas de populações de baixa renda. Segundo Brody (1998), esses pacientes desenvolvem deficiências nutricionais, sendo mais susceptíveis à deficiência em fosfatos, tiamina, riboflavina, vitamina B6 e magnésio, principalmente quando a ingestão dessas substâncias é baixa. Alterações morfológicas e do transporte de nutrientes pela placenta têm sido descritas após o uso crônico de etanol, estes achados podem estar envolvidos no agravamento do desenvolvimento fetal na presença de desnutrição materna (SILVA, 2000). Assim, quando associado à desnutrição, as consequências para o feto podem ser potencializadas, pois alguns efeitos do álcool só se manifestam na presença concomitante da desnutrição (SILVA, 2000). Em populações de baixa renda da região norte e nordeste do Brasil a situação agrava-se, pois a ingestão frequente de cachaça, bebida de alto teor alcoólico (SILVA, 2000) e de baixo valor comercial, está associada à utilização de dietas caracterizadas por baixo valor nutricional e teor protéico.

Os mecanismos pelos quais o álcool associado à desnutrição produz efeitos no SNC em desenvolvimento ainda não foram totalmente compreendidos e/ou elucidados, assim,

diante do exposto, nos propomos a avaliar os possíveis efeitos lesivos, ocasionados pela associação álcool-desnutrição, sobre a morfologia do córtex visual de ratos, com o intuito de oferecer subsídios para maior conhecimento do assunto. Para tanto, realizou-se uma Revisão de Literatura onde foram expostos os conhecimentos sobre o tema em questão e no capítulo de Resultados foi anexado um artigo original submetido à Revista Brain Research.

O uso do álcool e da desnutrição isoladamente ou em associação, durante o desenvolvimento perinatal, pode ocasionar alterações morfológicas em neurônios NADPH-diaforase do córtex visual de ratos, tais como: redução da densidade neuronal, redução da área e perímetro do soma neuronal bem como do número e extensão dos prolongamentos primários de neurônios.

Objetivo Geral

Analisar o efeito do álcool e da desnutrição sobre a morfologia de neurônios do córtex visual de ratos durante o desenvolvimento perinatal.

Objetivos Específicos

Avaliar morfometricamente a morfologia de neurônios do córtex visual de ratos que foram submetidos ao álcool e à desnutrição, através dos seguintes parâmetros:

- Densidade neuronal nas camadas do córtex visual;
- Área e perímetro do soma dos neurônios NADPH-diaforase ;
- Número e extensão dos prolongamentos primários dos neurônios NADPH-diaforase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Formação e desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Apesar dos avanços no estudo do sistema nervoso nos últimos anos muitas questões em relação a como esse sistema trabalha e como sua fisiologia é influenciada por sua morfologia tem sido ainda pouco investigada (FERREIRA, 2008).

Estudos da migração celular do tubo neural primitivo têm contribuído para entender como são construídas as camadas corticais em indivíduos adultos (MARIN – PADILLA, 1992; RAKIE, 1990).

O neocórtex cerebral adulto é constituído por seis camadas horizontais (MARIN-PADILLA, 1992), que são divididas internamente em colunas neuronais individuais, sendo ambas essenciais para o funcionamento normal do cérebro adulto (FERREIRA, 2008).

Em geral, a histogênese do SNC em todos os mamíferos é desenvolvida em três estágios (PONTES-FILHO, 2003):

1. Proliferação – etapa relacionada com a multiplicação (hiperplasia) das células da matriz, precursoras dos neurônios, e das células da glia;
2. Migração- estágio de desenvolvimento em que células neuronais e gliais se deslocam para seu habitat definitivo;
3. Diferenciação- condição em que as células neuronais e gliais aumentam de tamanho (hipertrofia) expressam seu fenótipo e se especializam.

A migração envolve o deslocamento do corpo de células neuronais da zona proliferativa para seu destino final no cérebro maduro (RAKIE, 1990). Estes eventos são regulados de tal forma a produzir uma densidade neuronal que é aproximadamente semelhante de uma área para outra no cérebro humano e no cérebro de várias espécies de mamíferos (TAKAHASHI, 1996).

Uma vez presente no seu destino final os diferentes tipos de neurônios e de células gliais iniciam o processo de diferenciação. Esse processo é estimulado por fatores de crescimento secretados por neurônios, células gliais e pela neurópila de regiões cerebrais mais precocemente amadurecidas, bem como por fatores de crescimento de origem hematogênica.

Estes fatores de crescimento são representados por proteínas, peptídeos e/ou neurotransmissores (MORGANE *et al.*, 1993). Os neurotransmissores, particularmente,

servem como sinal morfogenético ajudando na mielinização, na diferenciação de dendritos e axônios, na sinaptogênese e ainda na indução da apoptose (MATTSON, *et al.*,1991).

A regulação da migração de neurônios envolve diferentes populações celulares, precursores neuronais ou da glia radial e múltiplos mecanismos moleculares tais como o controle do ciclo celular, as interações célula-célula – usualmente mediadas por moléculas de adesão (CAM's), que inclui caderinas, selectinas, integrinas. Participam ainda deste mecanismo regulatório membros da superfamília IgG, a liberação de neurotransmissores e de fatores de crescimento e degradação, a ativação plaquetária, sinalização de transdução, (EDELMAN, 1998; GRESSENS, 2000) e o estado de arranjo e desarranjo dos microtúbulos no citoesqueleto (MILLER,1993).

O número de células, o grau de mielinização, de formação de sinapses e da arborização dendrítica, bem como a densidade de receptores, são posteriormente ajustados por modificações no potencial proliferativo e metabólico, assim como pela estimulação da apoptose fisiológica (MORGANE *et al.*,1993). Assim, o desenvolvimento do SNC envolve uma série de eventos de programação celular e molecular, incluindo um padrão de migração de neurônios e crescimento axonal (MARIN-PADILLA, 1992).

O estágio do período de desenvolvimento em que ocorre uma agressão parece ser o fator mais decisivo na determinação do defeito final apresentado pelo cérebro, do que propriamente o tipo de agressão, desta forma um mesmo insulto atuando em momentos variados determinaria alterações diferentes na morfofisiologia cerebral (MORGANE *et al.*,1993). A maturação cerebral envolve uma série de estágios sobrepostos temporalmente e que seguem uma precisa sequência que difere de região para região cerebral e mesmo dentro de região em particular, variando temporalmente de uma espécie para outra (MORGANE *et al.*, 2002).

A organização e conexões de células no sistema nervoso dependem do desenvolvimento do neocórtex neural durante sua embriogênese (RACKIE, 1990). Um caminho para conhecer as funções do sistema nervoso é o estudo dos efeitos de drogas na sua morfologia, estrutura, e então fisiologia. Em mamíferos, especialmente em humanos, o neocórtex tem uma estrutura complexa e suas várias conexões ainda permanecem desconhecidas ou pouco conhecidas (FERREIRA, 2008).

Geração, migração e diferenciação ocorrem principalmente durante o período pré-natal, mas em algumas áreas do sistema nervoso este fenômeno ocorre no período pós-natal, por exemplo, no cerebelo, (FUJITA, 1966), hipocampo (BAYER, 1982) e na zona sub-ventricular (RACKIE, 1990; ALTMAN, 1969; LOIS, 1994).

O maior número de neurônios no desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados é gerado em locais que são significativamente diferentes da sua localização no cérebro adulto. (MILLER, 1993).

Os vários grupos de neuroblastos migram em diferentes estágios, alguns antes de outros, subsequente ao alongamento axonal, seguindo precursores com funções específicas que estabelecem o futuro da identificação neuronal, suas propriedades funcionais, e futuras conexões a fim de definir as distintas camadas no neocórtex adulto (FERREIRA, 2008).

O processo de laminação é associado com o nascimento de neurônios que usam a glia radial para alcançar seu destino final (MILLER, 1993; SUPÉR, 1998; MAEDA, 1998). Neurônios migram para encontrar seu *lôcus* específico e para competir com outros neurônios por conexões sinápticas, o sistema nervoso em desenvolvimento produz então muitos neurônios em que a maior parte deles sobrevive com muitas conexões e formam a melhor organização encefálica. Sendo a estratificação horizontal e vertical no neocórtex cerebral muito importante para a fisiologia cerebral normal (FERREIRA, 2008).

Os primeiros neurônios a migrar são formados a partir da camada neocortical profunda, considerando que os últimos neurônios migram para formar a camada mais superficial, (SIDMAN, 1973; CAVINESS, 1982).

O processo de migração das zonas ventricular e sub-ventricular não deveria ser interrompido, pois isto resultará em desordens anatômicas e funcionais (WILSNACK, 1981; VÉLEZ-DOMINGUEZ, 1998), assim como problemas metabólicos (ZHU *et al.*, 2004).

Quando ocorrem problemas na migração neural, as camadas podem apresentar a ordem natural invertida, com despovoamento neuronal da camada interior (REDECKER *et al.*, 1999). Anormalidades genéticas ou fatores epigenéticos podem gerar desordens nas células da glia e em relação ao neurônio-glia no período crítico de desenvolvimento, estes problemas geram várias anormalidades estruturais, funcionais e moleculares (SUPÉR, 1998; VALLES *et al.*, 1996).

Desordens relatadas na migração de neurônios conduzem à malformação fetal que afetam milhões de neurônios precursores epidérmicos das zonas ventricular e sub-ventricular para a camada germinativa. Estes fatores produzem mudanças importantes na citoarquitetura, laminação e fisiologia neural, principalmente no neocórtex cerebral, que está infectado, intoxicado, exposto à radiação ou geneticamente perturbado (VÉLEZ-DOMINGUEZ, 1998).

De fato, outros problemas com a migração de neurônios podem ser gerados por desativação das células radiais da glia. As células radiais da glia são o suporte para o movimento neuronal e condução destas células para o local correto no cérebro adulto para a construção de circuitos normais para a formação de sinapses (MILLER, 1993; SUPÉR, 1998).

Retardo na migração pode conduzir uma desarmonia no desenvolvimento cortical e isto ser nocivo para a formação de circuitos no cérebro adulto (MILLER, 1993).

O consumo de drogas, especialmente o etanol, pode gerar inúmeros distúrbios na migração neuronal, especialmente quando consumidos pela mãe no período específico de desenvolvimento do embrião ou feto (AVERSI-FERREIRA, *et al.*, 2004; AVERSI-FERREIRA, *et al.*, 2006). Cuidados com a saúde da mãe são, portanto, essenciais para a futura saúde de seus descendentes (MARIN-PADILLA, 1992).

Influências genéticas e ambientais atuam sobre as células durante todo o processo de desenvolvimento do sistema nervoso, estimulando seu crescimento, sua migração e diferenciação, e até mesmo sua morte e retração axônica para criar o sistema nervoso adulto. Alguns destes processos são completados intra-útero, enquanto outros continuam durante os primeiros anos após nascimento (GUEDES, 2009).

2.2 Álcool

Na mitologia, o uso do álcool é muitas vezes relatado como substância divina e alguns pesquisadores consideravam o álcool como o maior constituinte da dieta humana, essencial não somente para suprir e manter o “equilíbrio hídrico”, como também para prover calorias (VALLEE, 1994).

Posteriormente, o consumo excessivo de vinho e cerveja passou a representar sérios problemas, sendo assunto de debates entre os filósofos da época, como Platão, Sócrates e Xenofan (O'BRIEN; ALEXANDER, 1980), chegando-se a um consenso de que o consumo

excessivo não mais atendia aos objetivos primários do consumo do vinho e da cerveja, centralizados nos efeitos da “inspiração, socialização e tranquilidade” (VALLEE,1994).

Inicialmente, as bebidas tinham conteúdo alcoólico relativamente baixo (vinho e cerveja), já que dependiam exclusivamente do processo de fermentação. Com o advento da técnica de destilação produzida na Europa, pelos Árabes na Idade Média, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas, que passaram a ser utilizadas na sua forma destilada. Nesta época, os destilados começaram a ser considerados como remédio para todas as doenças (USP/CEBRID, 2002).

Galduróz (2004), em estudo epidemiológico sobre o uso de álcool no Brasil demonstrou uma prevalência de 11,2% da dependência alcoólica, sendo de 17,1% para o sexo masculino e 5,7 % para o feminino. Havendo uma maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste, com valores acima de 16%, sendo 9% pertencente aos adolescentes (12 a 17 anos de idade). Pechansky (2004) analisando os dados de acordo com a região brasileira encontrou uma maior prevalência do uso de álcool na região Sul (54,5%), porém, havendo maior prevalência de dependência alcoólica nas regiões Norte e Nordeste (9,2 e 9,3 % respectivamente).

No Brasil, em especial nas regiões Norte-Nordeste, sabe-se que é prática comum a ingestão de bebida alcoólica extraída da cana-de-açúcar conhecida e comercializada como “aguardente” com teor de etanol em torno de 42%.

Sendo o etanol uma molécula simples, fracamente carregada, formada por dois carbonos e uma hidroxila, se move com facilidade através das membranas celulares, atingindo rapidamente um equilíbrio entre o sangue e os tecidos (BURGOS, 2003). Por ser uma molécula pequena, solúvel em água e em lipídios, o etanol permeia todos os tecidos e pode, quando em uso crônico e abusivo, causar uma ampla variedade de alterações sistêmicas (BURGOS, 2003).

Um dos principais locais de ação tóxica do etanol nas células é a membrana plasmática. Vários estudos têm demonstrado a existência de correlações entre o nível de intoxicação e a extensão de desordens na membrana celular resultante da ação do etanol. A ingestão do álcool afeta as membranas plasmáticas e organelas celulares devido ao metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, predispondo os tecidos às injúrias (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006).

O uso do etanol constitui um problema social em todo o mundo, devido a seus efeitos deletérios sobre o organismo humano e principalmente no sistema nervoso (SILVA, 2006). O etanol é uma neurotoxina que altera as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas afetando a embriogênese, a migração e diferenciação celular. A exposição pré-natal ao etanol afeta o desenvolvimento do sistema cardiovascular, músculo-esquelético e o SNC (SILVA, 2006). Sendo o SNC o mais susceptível à toxicidade do etanol (ÖZER, 2000).

Silva e colaboradores (2006) relatam que o uso da aguardente durante o desenvolvimento perinatal reduz o peso corporal dos animais tratados em relação ao grupo controle, que ingeriu água, supõe-se que o fato da aguardente ser formada por diferentes alcoóis, e principalmente por ser adoçada artificialmente, daria um suporte calórico maior aos lactantes diminuindo assim a procura pelo leite materno, ao contrário do etanol que fornece calorias vazias (PONTES-FILHO, 2003).

O consumo de bebidas alcoólicas é conhecido como carcinógeno humano, estando envolvido no aumento do risco de câncer no trato gastrointestinal. A formação do acetaldeído como metabólito do etanol é o principal agente causador de câncer, estando relacionado com o dano genotóxico e consequentemente a um aumento no número de micronúcleos em linfócitos humanos (BROOKS e THERUVATHU, 2005).

Silva e colaboradores (2006) relataram presença acentuada de micronúcleos nas células dos animais que foram expostos à aguardente, demonstrando uma possível neurotoxicidade desta sobre as células do córtex cerebral. Observaram ainda, que no grupo exposto à aguardente no período perinatal ocorreu redução do peso corporal e encefálico ao nascer, no desmame e aos 40 dias de vida.

A resposta do organismo à ingestão de álcool é bastante variável (LIEBER, 1994), dependendo da dose ingerida, concentração da bebida e distribuição no sangue (alcoolemia), bem como das variações individuais da capacidade de metabolização, relacionadas ao sexo, idade, raça, genética (THOMAS *et al.*, 2000), estado nutricional, uso paralelo de medicações e a presença ou não de patologias (DANTAS, 1983).

2.3 Álcool e o Sistema Nervoso Central

Embora seja uma droga de estrutura química simples e de ação farmacológica fraca, em comparação com outras drogas, o etanol produz, sem dúvidas, efeitos lesivos sobre o

SNC. Para produzir toxicidade, necessita de alguns gramas, enquanto outras substâncias o fazem com doses mínimas (miligramas) (FADA e ROSETTI, 1998).

A diversidade dos mecanismos e dos sítios de atuação do etanol é decorrente da presença do grupo hidroxila, que o torna solúvel e permite a formação de pontes de hidrogênio com aceptores ou doadores de elétrons de proteínas ou fosfolipídios de membranas celulares, ou com água da matriz extracelular (ABRAHAM *et al.*, 1991; BARRY *et al.*, 1994; YURITTAS *et al.*, 1992).

Shibley e colaboradores (1999) afirmam que, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, a teratogenicidade do etanol resulta de efeitos diretos e indiretos. Para eles, os efeitos diretos são causados pela interação do etanol com a célula fetal; e os indiretos podem ser definidos como qualquer perturbação do desenvolvimento fetal resultante da exposição, excluída a interação etanol-célula.

Na interação etanol-célula estão incluídas: as disfunções das circulações sanguíneas, placentária e fetal, induzidas pelo etanol, a ação teratogênica do acetaldeído (metabólito primário do álcool), e a desnutrição materna. Um dos mecanismos de toxicidade indireta do etanol sobre o cérebro é decorrente de sua ação sobre os vasos sanguíneos (SHIBLEY *et al.*, 1999).

O álcool, quando ingerido pela gestante, atravessa a barreira placentária e faz com que o feto receba as mesmas concentrações da substância que a futura mãe. Porém, a exposição fetal é maior, devido ao fato de que o metabolismo e eliminação são mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado de álcool (acetaldeído). Essa situação é ocasionada pela ausência de enzimas em quantidade necessária para a degradação de tais substâncias (TEOH *et al.*, 1994).

Estudos prospectivos avaliando os efeitos do consumo social na gestação evidenciaram déficit no crescimento intra-uterino, má-formação congênita, baixo escore de APGAR, alteração na contratilidade cardíaca, anormalidade para sucção, inatividade, dificuldade de adaptação a situações, desorientação da cabeça e outros órgãos relacionados ao Sistema Nervoso Central (COBO, 1973; MENELLA, 1997; BEAUCHAMP, 1991; REN *et al.*, 2002; STREISSGUTH *et al.*, 1980).

A circulação placentária e a circulação cerebral fetal, são meios de transporte fundamentais para o fornecimento de substâncias essenciais ao desenvolvimento e maturação

do SNC (SHIBLEY *et al.*, 1999). Através dessas vias, fatores de crescimento têm acesso ao tecido cerebral em formação induzindo a hiperplasia e a diferenciação de células neuronais e gliais. Por esse motivo qualquer alteração fisiopatológica que venha a interferir na perfusão cerebral irá comprometer o amadurecimento desse órgão, pois pode alterar o aporte de fatores de crescimento e consequentemente o processo de proliferação e diferenciação das células cerebrais (PHILLIPS *et al.*, 1997). Segundo estes autores, os mecanismos lesivos dos vasos sanguíneos são dependentes do tempo de exposição, da concentração sanguínea, e da variada sensibilidade das diversas regiões cerebrais ao etanol (PHILLIPS *et al.*, 1997).

Mães alcoólistas, quando expostas ao etanol durante o pré-natal, demonstram distúrbios sistêmicos em seus descendentes, causando anormalidades físicas e mentais nos recém-nascidos, tanto em humanos quanto em modelos experimentais. O abuso de álcool durante a gravidez pode causar desordens no desenvolvimento neural (STRATTON, 1996), que são comumente manifestadas com prejuízo das funções cognitiva e comportamental (ABEL, 1995).

Em seres humanos e em animais ocorrem alterações degenerativas estruturais que afetam as áreas corticais e mesencefálicas e que estão correlacionadas a interferências dos processos cognitivos. Devido ao papel das estruturas corticais nas funções cognitivas e no controle do ambiente motivado, alterações estruturais nessa área cerebral podem ter um importante papel no início e no desenvolvimento do alcoolismo (ARNSTEN *et al.*, 1994).

Vários estudos comprovaram alterações na proliferação, migração e diferenciação neuronal, no crescimento dendrítico, na condutividade entre neurônios e frequentemente morte neuronal; e ainda o comprometimento de elementos não neuronais que podem afetar indiretamente a função cerebral (GUEDES e FRADE, 1993; MARCUSSEN *et al.*, 1994).

Um aspecto importante é o fato de certas áreas cerebrais serem mais susceptíveis às agressões, pelo fato de possuírem uma maior densidade neuronal nas suas diferentes camadas. Segundo Peters *et al.*, (1985) o córtex somatosensorial é mais susceptível aos efeitos da exposição gestacional ao etanol que o córtex visual.

O uso do etanol durante o desenvolvimento demonstra decréscimo no número de sinapses por unidade de área cerebral, e análises morfométricas dos neurônios hipocampais (*in vitro*), mostraram que a exposição ao etanol diminui o número de sinapses por dendrito. A exposição pré-natal ao etanol inibe o tamanho da árvore dendrítica e diminui o número de

ramificações dos dendritos em várias áreas cerebrais de roedores (COSTA E GUIZZETI, 2002).

A exposição ao etanol durante o desenvolvimento cerebral é frequentemente reconhecida como uma das principais causas de retardo mental em humanos (ABEL e SOKOL, 1986; CRAMER e DAVIDHIZAR, 1999). Modelos experimentais da Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) têm estabelecido que a exposição precoce ao etanol seja capaz de induzir importantes alterações estruturais no córtex cerebral, (MILLER e DOW-EDWARDS, 1988; MILLER e POTEMPA, 1990), assim como um forte rearranjo em suas conexões (GRANATO *et al.*, 1995). No entanto, mesmo se os dendritos anormais representam uma consistente correlação anatômica ao retardo mental, pouco se conhece sobre a dinâmica do crescimento de remodelagem dos dendritos corticais durante a Síndrome Alcoólica Fetal.

Granato (2003) estudando ratos adultos expostos ao etanol durante a primeira semana de vida pós-natal verificou, através de um modelo computacional, que o etanol afeta principalmente a ramificação dos dendritos bem como seu alongamento (prolongamento).

Phillips e colaboradores (1996) sugeriram que alterações ou retardo no desenvolvimento dos vasos sanguíneos ou da barreira hematoencefálica fetal, formada pelo endotélio vascular e a bainha perivascular astrocitária, interferindo no aporte de fatores de crescimento e consequentemente no processo de proliferação e diferenciação das células cerebrais.

Modificações funcionais no SNC foram visíveis em modelos experimentais (THOMAS *et al.*, 1998), tais como: déficit no aprendizado (4º e 9º dia), mesmo quando avaliado seis meses após a exposição alcoólica (KLINTSOVA *et al.*, 1998).

Quando comparados em períodos de gestação/lactação, observa-se retardo no abrir de olhos, naqueles submetidos à exposição alcoólica nos dois períodos, redução na formação da mielina cerebral, peso diminuído do cérebro e órgãos, mais severo na lactação e atraso de crescimento corporal mais significativo na gestação (LANCASTER *et al.*, 1984).

Parece haver uma relação causal entre o momento de exposição ao etanol e o efeito sobre o número de neurônios na estrutura, já que o efeito tóxico é maior quando a célula está em seu último ciclo antes de iniciar sua migração. Isto pode ser o resultado de efeitos diferenciais em distintas zonas germinativas originando dois tipos de populações neuronais (MILLER e POTEMPA, 1990), dando suporte à hipótese de que há uma “janela de

vulnerabilidade” para regiões cerebrais e populações neuronais específicas (MOONEY *et al.*, 1996).

O etanol, nas células, parece atuar em todas as etapas do processo básico de desenvolvimento do SNC, observando-se desde o bloqueio de receptores para neurotransmissores (GIL-MARTÍN *et al.*, 1996), interferência no processo de mielinização (ÖZER *et al.*, 2000), bem como na expansão e modelamento axônico e dendrítico (MORGANE *et al.*, 1993) até a perda neuronal (NIXON e CREWS, 2002). MECANISMOS

Luo e Miller (1998) e Özer e colaboradores (2000) sugeriram que o etanol bloquearia a proliferação dos precursores neuronais por interferir na ação de fatores de crescimento mitogênicos tais como, os fatores de crescimento fibroblástico e plaquetário. Por outro lado, no nível molecular o álcool age devido a sua interação com proteínas altamente específicas das membranas neuronais, afetando canais iônicos, receptores, neurotransmissores, transportadores e vias sinalizadoras de transmissão, levando em curto prazo a modificações na regulação da função celular. Estas modificações no cérebro são base de muitos dos eventos neurológicos agudos e crônicos observados no alcoolismo (DIAMOND e GORDON, 1997).

Os distúrbios do SNC relatados como seqüelas da exposição pré-natal ao álcool incluem retardo mental de intensidade variável, atraso do desenvolvimento motor, problemas de fala e linguagem, distúrbios do equilíbrio, comportamentos hiperativos com déficit da atenção, incluindo hiperatividade, impulsividade, atenção diminuída, labilidade emocional e medos anormais (SILVA, 2000).

Para Costa e Guizzeti (2002) quando o etanol é administrado durante o terceiro trimestre de gravidez em humanos e durante as duas primeiras semanas pós-natal em ratos, o efeito mais notável é a microcefalia, observada em 80% dos casos de SAF.

A exposição pré-natal ao etanol é a causa de várias anormalidades no desenvolvimento do córtex cerebral, e o desenvolvimento anormal pode resultar em distúrbios funcionais no adulto (GRESSENS, 2000; MILLER, 1993; VÉLEZ-DOMINGUEZ, 1998). O etanol retarda a migração neuronal (MILLER, 1993; LIESI, 1997) dificultando a construção normal da morfologia do córtex cerebral.

A localização neuronal depende de fatores espaciais e temporais e a intoxicação por etanol interrompe os vários fatores necessários através do qual o neurônio é reconhecido no seu destino final, este local é muito importante para o funcionamento neuronal adequado no

cérebro adulto, uma vez que esta posição facilita a formação de sinapses (AVERSI-FERREIRA *et al.*, 2004).

A aquisição celular pode ser diminuída por defeito na proliferação ou por um aumento na deleção celular, além disso, a ação do etanol interfere na velocidade de aquisição da mielina. Essa diminuição parece ser relatada como uma alteração na função dos oligodendrócitos e não como uma aberração no tamanho e número dos axônios (OZER, 2000).

Apesar de terem sido conduzidos vários estudos sobre os efeitos crônicos da exposição ao etanol no sistema nervoso de mamíferos (MILLER, 1993; GREEN, 2004), apenas poucos estudos têm investigado os efeitos agudos do etanol em dias específicos da gestação (AVERSI-FERREIRA *et al.*, 2004; AVERSI-FERREIRA *et al.*, 2006).

Estudos dos distúrbios neurais, causados pelo consumo crônico de etanol, têm detectado heterotopia e redução de neurônios em várias regiões do cérebro (MILLER, 1993; VÉLEZ-DOMINGUEZ, 1998).

Trabalhos de Aversi-Ferreira e colaboradores (2004 e 2006) demonstraram que apenas um dia de exposição ao etanol é suficiente para gerar alterações importantes na estrutura neural de ratos recém-nascidos. Estes autores injetaram etanol no 12º dia de gestação de ratas e estudaram seus efeitos na descendência verificando heterotopia neuronal generalizada, redução neuronal em lobos do neocórtex, (AVERSI-FERREIRA *et al.*, 2005; AVERSI-FERREIRA, 2005), no entanto, o cerebelo permaneceu inalterado, provavelmente porque as células neuronais nesta estrutura surgiram em dias diferentes das do neocórtex (LIESI, 1997; SOUZA *et al.*, 2006).

O etanol influencia o desenvolvimento colinérgico (SWANSON, 1996; HEATON, 1996), gera alterações gliais (VALLES *et al.*, 1996; DLUGOS, 2000) e reduz a densidade das células de Purkinje (RIABININ *et al.*, 1995).

Ikonomidou e colaboradores (2000) relataram que os efeitos deletérios do álcool no desenvolvimento do encéfalo humano são pobremente entendidos e que a vulnerabilidade do cérebro ao etanol coincide com o período de sinaptogênese e concluiu que a apoptose está associada com o bloqueio de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e também excessiva estimulação dos receptores GABA (ácido gama aminobutírico).

Alguns trabalhos estudaram os efeitos do etanol no neocórtex, (AVERSI-FERREIRA *et al.*, 2004; GREEN, 2004), bulbo olfatório, (AVERSI-FERREIRA *et al.*, 2006) e cerebelo (SOUZA *et al.*, 2006) no 12º dia de vida intrauterina em ratos, estes artigos relataram que a ingestão de etanol em dias específicos de gestação, chamado dia do nascimento neuronal, gera alguns problemas como os observados na SAF.

Chen e colaboradores (2003) relataram que estudos de anormalidades cerebrais são muito importantes para a investigação sobre os efeitos do álcool no sistema nervoso e no desenvolvimento de várias regiões do cérebro, uma vez que estas regiões não são uniformemente vulneráveis ao álcool.

Calhoun e Warren (2007) em um recente estudo de revisão consideraram a SAF um diagnóstico médico objetivo. Pollard (2007) relatou que o desenvolvimento do cérebro é extremamente vulnerável aos efeitos de drogas, principalmente pelo fato da ausência protetora da barreira hematoencefálica. Spadoni e colaboradores (2007) e Chen e colaboradores (2003) relataram que certas áreas do cérebro são consideravelmente vulneráveis aos efeitos do etanol. Spadoni *et al.*, (2007) e Harper (2007) consideraram a neuroimagem como sendo uma técnica importante para o diagnóstico dos distúrbios alcoólicos fetais porque esta técnica demonstrou que a exposição pré-natal ao álcool causa alterações permanentes na estrutura do cérebro.

O fato de a SAF ter sido identificada e descrita pela primeira vez na literatura, na década de 70 (JONES *et al.*, 1973), quando ainda era bastante reduzido o número de mulheres que consumiam álcool, justificava-se a ausência de informações médicas e nutricionais sobre o consumo de bebidas alcoólicas no período de aleitamento. Vitolo e colaboradores (1994) referiram em trabalho realizado em São Paulo, que as lactantes consideravam a cerveja preta como lactogôgo.

Dados brasileiros constatarem uma prevalência de 11,2% de alcoolismo na população, com predominância masculina (17,1%), porém com prevalência de 5,7 % na população feminina (GALDUROZ, 2004). Desta forma, segundo Aversi – Ferreira (2008), em seu artigo de revisão, relata que o consumo de etanol deve ser proibido para as mulheres durante a fase gestacional para preservar a saúde do feto. Sendo o consumo agudo do etanol em dias específicos um sério problema de saúde pública porque a exposição aguda ao etanol próximo a oito ou nove semanas de gestação tem demonstrado ser potencialmente nocivo aos tecidos do feto.

2.4 Desnutrição e Dieta Básica Regional (DBR)

A nutrição, processo que envolve as proteínas alimentares, o metabolismo, o sistema nervoso e as condições emocionais dos indivíduos, tem influência direta nas condições de saúde das populações (VITOLO, 2003).

Estudos utilizando dietas semi-sintéticas foram desenvolvidos para reproduzir em animais de laboratório características clínicas, bioquímicas e patológicas, observadas em seres humanos desnutridos (McGUIRE, 1995; TEODÓSIO, 1990; TONKISS *et al.*, 1993).

A nutrição, como descrito anteriormente, desempenha papel crucial na maturação e manutenção funcional do SNC. Sendo a nutrição inadequada, durante os primeiros anos de vida, ainda um sério problema de saúde nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A desnutrição grave afeta 20 milhões de crianças menores de cinco anos no mundo, matando uma criança a cada 30 segundos, e no Brasil é uma das maiores causas de mortalidade infantil (OMS, 2007).

Diante da realidade do Nordeste Brasileiro, Teodósio *et al.*, (1990) desenvolveram um modelo experimental que reproduz, em ratos, quadro clínico semelhante ao da desnutrição infantil protéico-energética prevalente nesta região. Sendo assim elaborada, para animais de laboratório, uma dieta constituída por quatro alimentos mais consumidos no regime alimentar deficitário das populações de baixa renda da Zona da Mata de Pernambuco. Esta dieta foi denominada como Dieta Básica Regional (DBR), que se caracteriza principalmente pelo déficit protéico, contendo apenas 8% de proteínas. O uso desta dieta mimetiza a desnutrição protéico-energética vigente no Nordeste Brasileiro (PESSOA, 2005).

A dieta das pessoas que vivem abaixo da linha da pobreza não é adequada em termos de valores calóricos e contém muito pouco conteúdo protéico (RANADE, 2008).

A DBR é rica em carboidratos e fibras, mas pobre em proteínas (8%), as quais são predominantemente de origem vegetal e gordura. A desnutrição induzida pela DBR pode levar a alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais (MEDEIROS, 2002; PESSOA, 2000), bem como, efeitos deletérios sobre a gestação e a lactação (PESSOA *et al.*, 2000), associada ao etanol (PONTES-FILHO, 2003) e ao exercício físico (PRAZERES, 2004).

Pessoa e colaboradores (2005) demonstraram, em estudos com 159 animais de laboratório, em três gerações sucessivas, os efeitos cumulativos do consumo da DBR e

observaram redução da curva ponderal, do ganho de peso, do comprimento da cauda e do consumo alimentar.

Os nutrientes são necessários não só para neurônios, mas também para dar suporte às células gliais. A proteína parece ser o componente mais crítico a interferir durante o período de crescimento rápido do cérebro. Assim a síntese de proteínas estruturais, o crescimento, a organização funcional e a produção de neurotransmissores cerebrais dependem da disponibilidade de aminoácidos essenciais contidos nas proteínas da dieta (WINGGINS, 1984). Tatli (2007) relata que não só uma desnutrição protéica severa, mas também moderada tem efeitos deletérios nas estruturas do SNC.

2.5 Desnutrição e o SNC

A desnutrição pode ser causada pela disponibilidade de todos os nutrientes, porém em quantidades insuficientes ou pela falta de um ou mais nutrientes essenciais (GUEDES, 2009). Estudo utilizando modelos animais sugere que os efeitos do insulto nutritivo no desenvolvimento do cérebro são duradouros e levam a déficits permanentes no aprendizado e no comportamento (GUEDES, 2009).

A desnutrição é um problema mundial que afeta milhões de crianças durante os estágios de desenvolvimento do sistema nervoso central. Interferências na maturação cerebral podem resultar em alterações fisiológicas, anatômicas, comportamentais, anormalidades na função cognitiva, de aprendizado e memória. Sendo a inadequação nutricional, incluindo a materna, o maior fator não genético que leva a distúrbios no desenvolvimento do cérebro (MORGANE, 2002).

A deficiência nutricional precoce, possibilitada pela modificação na diferenciação celular e/ou pela modificação da função dos estágios críticos de desenvolvimento, pode, em longo prazo, influenciar no risco de doenças (CABALLERO, 2002).

A ocorrência de deficiência nutricional durante o período crítico de formação do sistema nervoso resulta em alterações morfológicas, neuroquímicas e comportamentais. Para tanto, se faz necessária uma nutrição adequada durante a formação do SNC e sua organização funcional (PEREIRA-SILVA, 2007).

A desnutrição altera o ritmo de proliferação das células-tronco neurogliais, afetando secundariamente estágios posteriores do desenvolvimento. A proliferação dessas células

precursoras seria reduzida devido a sua maior necessidade nutricional, uma vez que essas células para se multiplicarem precisam produzir DNA (ácido desoxirribonucléico) em grande quantidade (MORGANE *et al.*, 1993).

Para o sistema nervoso, os efeitos da desnutrição são muito mais severos quando esta coincide com o período de crescimento rápido do cérebro, período este em que a neuronogênese, a gliogênese e a migração neuronal atingem a velocidade máxima em cada área cerebral. Esse período é também denominado de “período crítico” ou de maior vulnerabilidade neural a alterações nutricionais e a outros fatores ambientais, sensoriais, sócio-culturais e eletrofisiológicos (GUEDES, 1992).

Embora o crescimento encefálico seja menos afetado do que o restante do corpo pela desnutrição, uma pequena diminuição nos níveis ótimos de um simples nutriente durante o período crítico de crescimento cerebral pode significar um atraso no crescimento e diferenciação celular (MORGAN e WINICK, 1985), causando efeitos irreversíveis (DOBBING e SANDS, 1979). A reabilitação posterior não é capaz de reverter o dano na formação do SNC e na síntese e liberação de neurotransmissores (GONÇALVES, 2001). No entanto, há outras alterações estruturais e funcionais que são mais sutis e ocorrem em determinados períodos de desenvolvimento mais acelerado do cérebro, sendo, dependendo de sua natureza, passíveis de reversibilidade diante de reabilitação nutricional (MORGANE *et al.*, 1993). Dentre as alterações estruturais, as principais se referem ao menor número e tamanho de células cerebrais, bem como alterações nas ramificações dendríticas e na camada de mielina dos neurônios (MORGANE *et al.*, 1993).

Vilela (2005) observou uma redução de cerca de 20% na dimensão de cérebros de animais desnutridos desde a gestação e 10% nos desnutridos desde a lactação.

A quantidade inadequada de nutrientes causa efeitos danosos na formação de sinapses, uma vez que a formação destas se dá desde o período pré-natal do desenvolvimento até a vida adulta (GRANADOS-ROJAS *et al.*, 2002).

Sabe-se que desenvolvimento normal também depende da formação e diferenciação de células neurais, ocorrendo de forma inter-relacionada. Distorções na maturação coordenada de diferentes componentes cerebrais poderão interromper o crescimento ordenado e elaboração do circuito neural (MORGANE *et al.*, 2002). Atrasos em poucos eventos neurológicos isolados resultantes da desnutrição podem causar reações em cadeia

amplificando erros funcionais. Alterações temporais na progressão de processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento do SNC, podem levar ao déficit funcional permanente (MORGANE *et al.*, 2002). Estas alterações são claramente mais severas quando a desnutrição coincide com o chamado “brain growth spurt”, que corresponde às fases mais intensas de neuronogênese, gliogênese e migração neuronal (MORGANE *et al.*, 1993). Este fato decorre por duas razões fundamentais: primeiro porque os processos de hiperplasia, hipertrofia e mielinização, implicados na evolução neural, estão ocorrendo em grande velocidade; segundo porque em decorrência deste acelerado desenvolvimento, o sistema nervoso é neste período, altamente dependente do suprimento de nutrientes, os quais fornecem a “matéria – prima” e a energia necessárias ao seu desenvolvimento (GUEDES, 1992).

A desnutrição neonatal dificulta ainda a resposta fisiológica da plasticidade neural, impedindo processos de aprendizado e memória, assim como respostas às injúrias (REZENDE, 2006).

2.6 Álcool e Desnutrição

O álcool pode ser utilizado pelo organismo humano como fonte energética desde que constitua menos de 25% do total das calorias ingeridas por dia. O consumo de 35% a 50% ou mais, de forma crônica, caracteriza o alcoolismo. Em doses altas tende a ser metabolizado por vias que não produzem ATP (adenosina- tri-fosfato) e outras que geram principalmente calor, perdendo sua função energética e tornando-se tóxico para o organismo (BRODY, 1998).

A deficiência nutricional pode ser decorrente da redução da absorção do nutriente causada pela ação tóxica do etanol sobre o intestino; e em outros casos pelo catabolismo elevado de nutrientes específicos como ocorre com a vitamina A, que devido à elevação de citocromo P450 no fígado é convertida em produto inativo (BRODY, 1998).

Burgos e colaboradores 2004 relatam em seus estudos que os RNs (recém nascidos) de mães recebendo cerveja mostraram maior tendência ao ganho de peso e gordura corporal, além da redução da glicose e LDL-C (colesterol da lipoproteína de baixa densidade) neste mesmo estudo verificou-se que a bebida destilada provocou nos RNs aumento do peso do rim/cérebro, atraso na abertura dos olhos, alto percentual de mortos /devorados, redução da glicose e LDL-C. Concluindo-se que as bebidas alcoólicas , mesmo com teores reduzidos de

etanol, durante a lactação, podem provocar graves alterações no comportamento, nutrição e metabolismo, comprometendo o desenvolvimento normal dos RNs, além de elevar a morbimortalidade.

Esses resultados podem ser explicados em parte, pelos estudos de Streissguth e colaboradores, (1980) e Rosenberg, (1996) onde relatam que a desnutrição “in útero”, determinada pelo reduzido aporte de nutrientes, pode ser agravada no RN, pela ação indireta do etanol que reduz a capacidade de mamar, bem como de metabolizar nutrientes em razão das alterações hepáticas que apresenta.

Em relação aos macronutrientes, há evidências científicas de que o álcool altera o metabolismo intermediário dos carboidratos, lipídios e proteínas. A ingestão de 70g de álcool reduz o metabolismo protéico, no fígado humano (VOLPI, 1998), com alterações na síntese e/ou secreção de proteínas (BARAONA e LIEBER, 1979).

Halsted (1996) e Tavares (2001) estudando em ratos o efeito do etanol sobre a composição de ácidos graxos no tecido adiposo evidenciaram alterações na composição dos ácidos graxos essenciais, enquanto Denkins e colaboradores (2000) relataram desequilíbrios nos ácidos graxos poli-insaturados de recém-nascidos de gestantes alcoólicas moderadas.

Segundo Brody (1998) alcoolistas de populações de baixa renda desenvolvem deficiências nutricionais, sendo mais susceptíveis à deficiência em folatos, tiamina, riboflavina, vitamina B6 e magnésio, principalmente quando a ingestão dessas substâncias já é reduzida. Por esse motivo, Palencia e colaboradores (1994) já haviam enfatizado anteriormente a importância dos trabalhos efetuados em países subdesenvolvidos nos quais o alcoolismo é superposto a um substrato metabólico de desnutrição crônica não tendo esses distúrbios uma relação de causa e efeito, sendo sim a soma de duas entidades diferentes, porém comuns em populações de baixa renda.

As deficiências nutricionais, associadas ao etanol, podem também ser decorrentes da redução da absorção de nutrientes (BRODY, 1998), ou ainda, pela desnutrição “in utero”, determinada pelo reduzido aporte de nutrientes (ROSENBERG, 1996).

Assim, o álcool pode ser causa tanto de desnutrição primária, pelo fato de deslocar os nutrientes da dieta, como de desnutrição secundária, por ser responsável pela má absorção e agressão celular decorrentes de sua citotoxicidade direta (ARAÚJO, 2005).

Cardoso-Silva (2007) em seu trabalho de associação entre a ingestão de etanol e desnutrição protéica induzida pela DBR demonstrou uma diminuição bastante significativa do peso dos indivíduos submetidos ao tratamento álcool-desnutrição. Isto, provavelmente, deve-se ao fato de que a desnutrição “*in utero*” determina um reduzido aporte de nutrientes, o que incrementou os efeitos do álcool sobre a evolução do peso (SILVA, 2000).

Shibley e colaboradores (1999) sugerem que tais efeitos podem ser decorrentes da interferência do etanol em todas as três fases da nutrição fetal, isto é, a nutrição materna, a transferência placentária e o metabolismo fetal.

A associação alcoolismo-desnutrição ainda promove diminuição importante do peso corporal médio, aumento significativo no diâmetro médio dos vasos do endomiocárdio (ARAÚJO-FILHO, 2007), vacuolização dos hepatócitos e inflamação do fígado (CARDOSO-SILVA, 2007).

Há fortes evidências que o estado nutricional pode afetar o consumo de álcool (PRENTICE, 1995). Sabe-se que, em animais, dieta rica em carboidratos e rica em proteínas reduz o consumo alcoólico, enquanto uma dieta hipoglicídica/hipoprotéica produz efeito inverso (FORSANDER, 1998).

2.7 Álcool e Desnutrição no Sistema Nervoso Central

O desenvolvimento do cérebro, em termos anatômico, químico, fisiológico e comportamental, depende, em todas as espécies superiores, de fatores genéticos e diversos fatores ambientais, incluindo-se entre os últimos a nutrição e variáveis culturais, como o enriquecimento ambiental (MORGANE *et al.*, 1993).

Atualmente, já está bem caracterizada a síndrome do alcoolismo fetal, cujas características básicas são: retardo do crescimento pré e pós-natal, disfunção do sistema nervoso central (intelectual, neurológica e comportamental) e alterações faciais (olhos, nariz, maxilar, lábio) (FISHER *et al.*, 2001).

As alterações ocorrem principalmente no início da vida, este fato ocorre por duas razões fundamentais: em primeiro lugar, porque os processos implicados na evolução neural (hiperplasia, hipertrofia e mielinização) estão ocorrendo com grande velocidade (“brain growth spurt”); em segundo lugar, como decorrência do primeiro fato, o sistema nervoso é,

neste período, altamente dependente do suprimento de nutrientes, os quais fornecem a “matéria-prima” e a energia necessária ao seu desenvolvimento (GUEDES, 1992).

Para Morgane e colaboradores (1993) algumas agressões tóxicas eliminam células progenitoras, enquanto outros insultos, como a desnutrição, alteram o ritmo de proliferação das células-tronco neurogliais, afetando secundariamente os estágios posteriores de desenvolvimento. Em relação à desnutrição, a proliferação dessas células precursoras seria reduzida devido à sua maior necessidade nutricional, uma vez que essas células para se multiplicarem, precisam produzir DNA (ácido desoxirribonucléico) em grande quantidade.

No entanto, as diversas regiões do cérebro apresentam uma sequência de desenvolvimento temporal precisa e planejada intrinsecamente, cada uma com seu período crítico de desenvolvimento, sendo, desta maneira, variavelmente vulnerável às agressões durante todo o período de desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce (MORGANE *et al.*, 1993).

Agentes agressores que interfiram na formação (desnutrição), na exposição das moléculas de adesão ou na expressão de receptores (álcool) para essas moléculas na matriz extracelular, determinarão o retardo ou bloqueio da migração. O retardo fará com que neurônios jovens cheguem muito mais tarde aos seus alvos definitivos, prejudicando a formação dos circuitos neurais (PONTES-FILHO, 2003).

Portanto, durante toda a histogênese o cérebro em desenvolvimento é sensível aos efeitos nocivos do álcool e da desnutrição. As repercussões finais dessas agressões combinadas ou separadas dependerão do período de vida em que elas incidem bem como da sua duração, e serão expressas como alterações estruturais e funcionais (SCOTT *et al.*, 1992; MORGANE *et al.*, 1993; GUERRI, 1998), eletrofisiológicas (GUEDES e FRADE, 1993; PAIVA, 2002; ROCHA – DE MELO, 2001; SANTOS-MONTEIRO, 2002), cognitivas e comportamentais (CLARREN *et al.*, 1992, FADA e ROSSETI, 1998; MORGANE *et al.*, 1993), de variada intensidade, observadas tanto em RNs quanto em adultos.

2.8 Álcool, desnutrição e produção de Óxido Nítrico (NO) no SNC

Dentre os mecanismos intrínsecos estudados no desenvolvimento do SNC, destaca-se a ação do óxido nítrico (NO), por sua grande variedade de efeitos biológicos, como no controle do fluxo sanguíneo (PHILLIPS *et al.*, 1997) e da expressão genética (FREITAS *et al.*,

2002). Como substância mediadora, participa da comunicação neuronal, da plasticidade sináptica modulando também a resposta neuronal do sistema visual (PONTES FILHO, 2003).

Durante as etapas do desenvolvimento do sistema nervoso atua na mediação da diferenciação celular (OGURA *et al.*, 1996), regula a sobrevivência e a morte celular, além de atuar como neurotransmissor com função organogênica (NELSON *et al.*, 1997).

Em células de mamíferos, a produção de NO ocorre como consequência da conversão da L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Como a NOS é regulada por três (3) diferentes genes, podem ser produzidas três diferentes isoformas desta enzima (WINK e MITCHEL, 1998; VALLANCE, 2002). Duas delas, NOS-1 e NOS-3 são constitutivas, isto é, produzidas continuamente pelas células, possuem tempo de atividade curto, e são ativadas pela ligação cálcio-calmodulina. Ao contrário, a isoforma NOS-2 ou induzível, ou imune (iNOS) não está normalmente presente na célula e sua ativação requer a ação de citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos ou outros estímulos. Essa isoforma aparece rapidamente no meio intra e extracelular em praticamente todos os tipos de agressão ao cérebro e doenças neurológicas, continuando ativa durante vários dias após a indução (WINK e MITCHEL, 1998).

Essas diferentes isoformas de NOS têm sido caracterizadas e purificadas no cérebro em neurônios, células endoteliais, macrófagos e astrócitos. Como todas elas são hemoproteínas que requerem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e O₂ para a produção de NO, elas podem ser identificadas através da reação histoquímica da NADPH-diaforase (NADPH-d), indicadora da atividade catalítica da NOS (GONZALES-HERNANDES *et al.*, 1996; GABBOT e BACON, 1996).

A NOS-1 ou neuronal é a principal isoforma presente no cérebro estando co-localizada com a NADPH dos neurônios NADPH-d positivos (DAWSON e DAWSON, 1996).

Os astrócitos, as células da microglia e neurônios podem liberar grandes quantidades de NO após estimulação e desta forma suplementar o teor de óxido nítrico necessário às várias funções biológicas cerebrais dele dependentes, além disso, o NO microglial representa uma forma de proteção contra infecções e tumores (PAAKKARI e LINDSBERG, 1995), mediando a diferenciação celular (OGURA *et al.*, 1996) e regula os processos de sobrevivência e morte celular (INKONOMIDOU *et al.*, 2001).

O NO é um mediador gasoso difusível com diversas funções protéicas, está envolvido na sinalização do sistema nervoso, atua como mensageiro aumentando a ativação do terminal pré-sináptico (GARTHWAITE, 1991) e sua produção desordenada tem sido implicada em uma gama de doenças (HANALY, 2001; ALDERTON, 2001).

De maneira geral, no sistema nervoso, o NO parece participar dos mecanismos de plasticidade sináptica e particularmente daqueles envolvidos com certas formas de aprendizagem e memória (SCHUMAN E MADISON, 1994). Além disso, evidências experimentais demonstraram que o NO participa de processos patológicos de neurotoxicidade, da morte neuronal, que ocorre após isquemia focal (HUANG *et al.*, 1994). Portanto, as ações abrangentes do NO são observadas em processos fisiopatológicos (EVRARD, 2003).

O etanol interfere na expressão das isoformas de NOS constitutivas e induzível tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (SYAPIN, 1998). Em diferentes concentrações, e em diferentes espécies animais, a exposição aguda ao etanol suprime a produção de NOS-1, sendo uma das vias de bloqueio da sua síntese e inibição de receptores NMDA (N- metil-D-aspartato) que impedem a ligação cálcio-calmodulina (DILDY e LESLIE, 1989).

Da mesma forma a desnutrição, associada ou não ao etanol, interfere na produção de NO. Trabalhos experimentais demonstraram a importância da desnutrição no crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso, enfatizando em especial as alterações morfológicas no que se refere aos neurônios NADPH-d positivos presentes no córtex-visual. Picanço – Diniz e colaboradores (1998); Borba e colaboradores (2000); Rocha de Melo (2001) demonstraram alterações de diversos parâmetros, entre os quais: a diminuição da espessura cortical, da área do corpo celular e do campo dendrítico e a densidade neuronal, em ratos submetidos à desnutrição perinatal.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

As amostras, objeto do presente estudo, foram provenientes de trabalho científico prévio desenvolvido para defesa de tese de doutorado de Pontes-Filho (2003), e cedidas pelo autor (ANEXO A). A metodologia utilizada nesse trabalho foi apresentada e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/CCB/UFPE (ANEXO B).

3.2 Amostras

Foram utilizadas 69 lâminas contendo cortes histológicos do córtex posterior de ratos (Wistar) machos jovens (40 dias), sendo 33 corados pela marcação histoquímica da NADPH-diaforase e 36 pelo método do Cresil Violeta Acético (coloração de Nissl) obtidas a partir do protocolo experimental abaixo.

3.3 Protocolo Experimental

3.3.1 Animais

Foram utilizados 84 ratos machos jovens (40 dias) provenientes do acasalamento de 30 fêmeas adultas sem parentesco (matrizes com 120 dias de vida e peso médio de 235g)

Os animais, da linhagem Wistar, oriundos da colônia do Biotério do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde/UFPE, foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas (luminosidade entre 7:00 e 19:00 horas), com temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com sistema de exaustão, em gaiolas plásticas com grades metálicas (33x40x17 cm) e com oferta de água filtrada *ad libitum* durante todo o experimento.

3.3.2 Acasalamento

Para o acasalamento foram colocadas em cada gaiola 3 fêmeas e 1 macho. A prenhez era confirmada pela identificação de células descarnativas, muco gestacional e espermatozoides ao exame microscópico da secreção vaginal diluída em solução salina morna (Microscópio Zeiss Standard 25,10x). Esse exame foi executado diariamente por até 3 dias, no período matinal. Diante da negatividade do teste as fêmeas eram mantidas em repouso por 3 dias, reiniciando-se o procedimento com outro macho. Durante o desenvolvimento do protocolo experimental 12 fêmeas acasaladas (28%) morreram, sendo 9 do grupo exposto ao etanol (21%) e 3 tratadas com aguardente (7%). As mortes ocorreram durante o trabalho de

parto ou nas primeiras 48 horas após o mesmo. Na autópsia não foram observadas alterações macroscópicas hepáticas (esteatose) ou de outros órgãos. Entretanto, o exame da placenta evidenciou hiperemia em graus variados mais acentuada nas fêmeas tratadas com etanol. Os fetos não apresentavam alterações morfológicas macroscópicas, sendo semelhantes a recém-nascidos normais.

3.3.3 Grupos Experimentais

Confirmada a prenhez, as matrizes foram separadas de acordo com o protocolo experimental, no máximo 2 por gaiola, e mantidas até o 18º dia da gestação. A partir deste período foram transferidas para gaiolas individuais até o final do aleitamento (25º dia de vida dos filhotes). No período compreendido entre o primeiro dia de gravidez e o último do aleitamento, as matrizes foram submetidas a um dos seis diferentes protocolos resultantes da combinação de 2 tratamentos nutricionais, dieta comercial LABINA[®] (ANEXO C) ou DBR (ANEXO D), contendo respectivamente 23% e 8% de proteínas, com 3 tratamentos por gavagem (administração diária de água filtrada, de aguardente, ou de etanol).

A gavagem foi executada sempre entre as 7:00 e 9:00h da manhã, entre o primeiro dia de gravidez e o último do aleitamento. Os filhotes das matrizes assim tratadas originaram os 6 grupos experimentais descritos a seguir:

NUTRIDO (N) (n=14) – oriundos de mães mantidas com a ração LABINA[®] e recebendo água filtrada na dose de 3g/kg de peso corporal, em volume total de 3,8 mL;

AGUARDENTE NUTRIDO (A) (n=10) – procriados por mães alimentadas com LABINA[®] e recebendo aguardente comercial *in natura* (ANEXO E) na dose de 3g/kg de peso corporal, em volume total de 3,8 mL;

ETANOL NUTRIDO (E) (n=15) – procriados por matrizes mantidas com LABINA[®] e recebendo etanol na dose de 3g/kg de peso corporal, diluído em água filtrada, em volume total de 3,8 mL (Álcool Etilico Absoluto PA – VETEC[®]);

DESNUTRIDO (D) (n=14) – gerados por mães mantidas com a dieta DBR e recebendo, também, 3,8 mL de água filtrada;

AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD) (n=16) – gerados por matrizes alimentadas com DBR e tratadas com aguardente volume total de 3,8 mL;

ETANOL DESNUTRIDO (ED) (n=15) – gerados por matrizes alimentadas com DBR e recebendo etanol em volume total de 3,8 mL.

Após o desmame os filhotes foram mantidos com a dieta do grupo experimental correspondente até o dia da perfusão (40 dias) e obtenção do encéfalo. No terceiro dia após o parto executou-se a sexagem excluindo-se as fêmeas devido a conhecida influência dos hormônios sexuais femininos no metabolismo do álcool (BERMAN *et al.*, 1996). Os filhotes machos de cada grupo experimental, gerados por diferentes matrizes foram misturados entre si e mantidos em ninhadas de 4 a 6 animais. Estes procedimentos foram adotados no intuito de eliminar a formação de grupos contendo apenas filhotes irmãos e de uma única mãe, excluindo-se a possibilidade dos resultados obtidos serem influenciados pela susceptibilidade individual. Após o desmame, a administração de substâncias por gavagem foi interrompida e os filhotes foram mantidos com a dieta do grupo experimental correspondente até o dia da perfusão (40 dias).

3.3.4 Determinação do peso encefálico

No dia da perfusão, o peso encefálico foi aferido após sua retirada da caixa craniana, excluindo-se o bulbo olfatório, nervos cranianos, tronco encefálico e cerebelo, empregando-se balança analítica (ZEISS, modelo Sartorius).

3.3.5 Estudo Morfológico

3.3.5.1 Perfusão e Microtomia

Aos 40 dias de vida os filhotes foram pesados e anestesiados, por via intraperitoneal, com solução aquosa contendo uma mistura de Uretana a 10% (1g/Kg) e Cloralose a 0,45 (40 mg /Kg) de acordo com o peso corporal. Para execução da perfusão procedeu-se ampla abertura do tórax para a exposição do coração. Após a injeção de 0,1 ml de heparina (Liquemine[®]) no ventrículo esquerdo, para evitar a coagulação sanguínea, introduziu-se na mesma região uma cânula de polietileno (por onde foram injetadas as soluções de perfusão) e concomitantemente fez-se a abertura do átrio direito. Desta forma, tanto o sangue quanto as soluções de perfusão eram eliminadas por aquela abertura. Após o bloqueio da artéria aorta abdominal com uma pinça hemostática procedeu-se a perfusão com o auxílio de um compressor com pressão

regulada em torno de 90 mmHg. Para a remoção do sangue e manutenção da integridade tecidual injetou-se através da cânula um volume em torno de 100 a 150 ml de uma solução tampão, fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2-7.4 (PBS), contendo 0,9% por volume de NaCl. A seguir perfundiu-se um volume em torno de 150 a 300 ml de formaldeído a 10%, diluído em PBS a 0,9%, controlando-se a fixação do tecido pelo volume inoculado e a rigidez da cabeça e dos membros superiores. Finalizada a perfusão procedeu-se a abertura do crânio retirando-se o cérebro, excluindo-se o cerebelo, os nervos cranianos e o bulbo olfatório. A seguir marcou-se, com um corte longitudinal antero-posterior, o hemisfério cerebral esquerdo e mergulhou-se o encéfalo em solução tampão fosfato 0,1M preservando-o em geladeira até a microtomia, sendo esta realizada sempre entre 12 e 24 horas após a perfusão. No momento anterior à microtomia, o encéfalo foi dividido em 3 partes, mediante dois cortes coronais (Figura 1), utilizando-se navalha para microtomia e uma lupa estereoscópica com ocular milimétrica (Olympus, modelo TGHM), obtendo-se três fragmentos que foram denominados: posterior, médio e anterior.

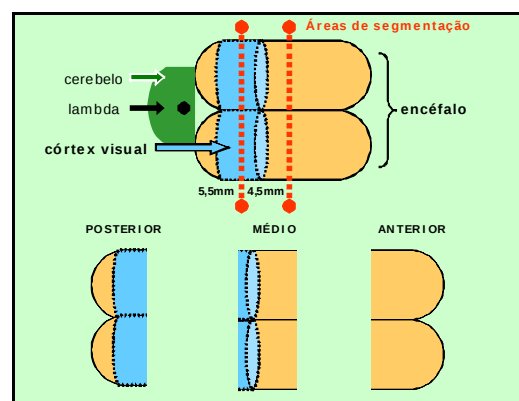


Figura 1 - Esquema da segmentação para obtenção dos fragmentos encefálicos coronais. Fonte: Pontes-Filho (2003).

O fragmento posterior correspondia à região encefálica posterior, indo da porção voltada para lambda e para o cerebelo até 5,5 mm em direção à região anterior do cérebro. O reconhecimento dos limites do córtex foi identificado através de comparações com um atlas estereotático (Paxinos e Watson,1998). Esse procedimento foi adotado para a obtenção de cortes histológicos coronais seriados do córtex posterior (fragmento posterior) (**Figura 2**).

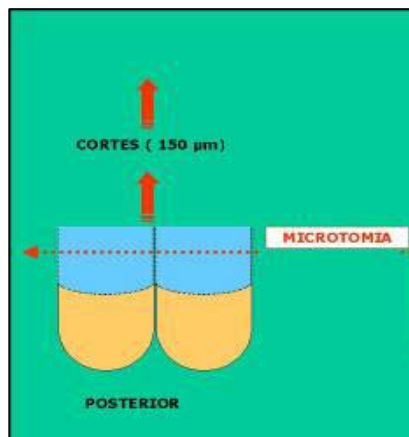


Figura 2- Esquema dos planos de microtomia para obtenção dos cortes histológicos coronais. Fonte: Pontes-Filho (2003).

3.2.5.2 Estudo Histoquímico

Para a marcação histoquímica da NADPH-diaforase utilizando-se um vibrátomo (Microslicer D. S. K. – Dosaka E. M. CO. LTD – Modelo DKT 3000 w), obtinha-se os 4 (quatro) primeiros cortes histológicos seriados, com espessura de 150µm, a partir da superfície de corte do fragmento posterior (córtex posterior). Todos os cortes foram imediatamente imersos em solução tampão fosfato 0,1M, lavados por três vezes consecutivas, 15 minutos cada, em TRIS 0,1M- pH 8,0 e conservados em geladeira até o início da reação histoquímica. Em todos os procedimentos a marcação histoquímica era executada imediatamente após a microtomia.

A seguir, os fragmentos encefálicos posteriores remanescentes foram colocados em formaldeído a 10% diluído em salina a 0,9%, durante 48 horas, submetidos à rotina histológica e emblocados em parafina. Após esse processamento executou-se a microtomia (Micrótoomo Yamato Koki, modelo horizontal), obtendo-se novamente os 4 primeiros cortes histológicos seriados de cada fragmento, com espessura de 4µm, que foram corados pelo método cresil violeta acético - coloração de Nissl (núcleo e corpúsculo de Nissl) (**Figura 3**).

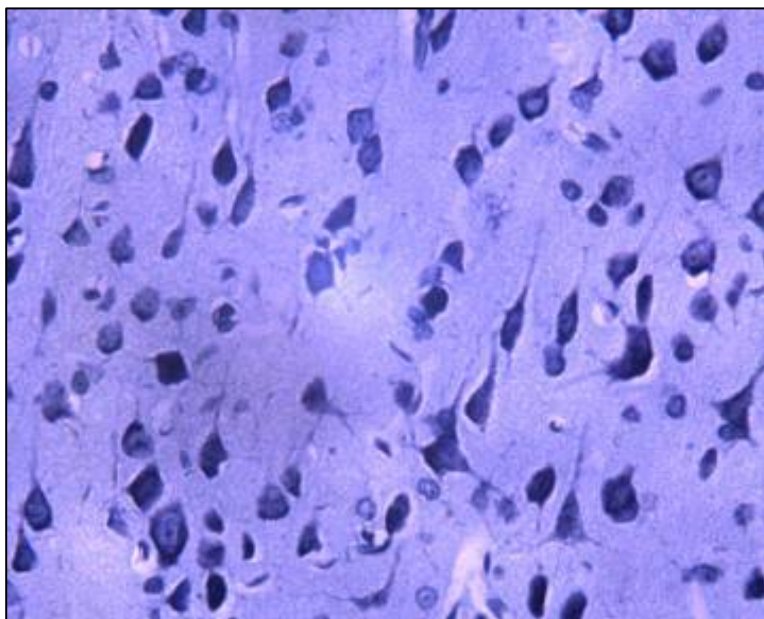
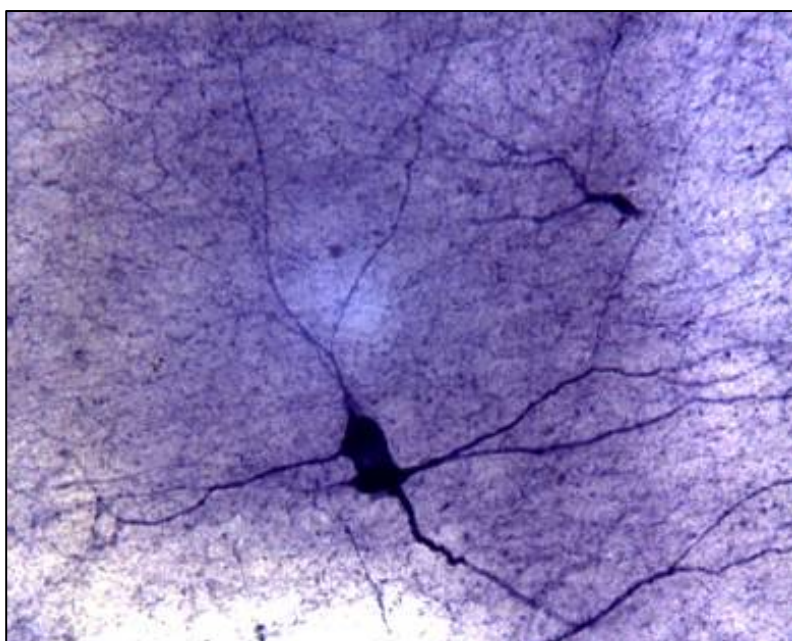


Figura 3: Fotomicrografia (400x) das células neuronais coradas pelo Cresil Violeta Acético

Foi utilizado o método indireto da enzima málica (SCHERER-SINGLER *et al.*,1983) para a marcação histoquímica das células NADPH-diaforase + (positivas). Para essa reação foram utilizadas placas plásticas para cultura de tecidos (Limbro[®] com 24 poços com 2cm² de área e 3,5 ml de volume). Em cada poço foi colocado um corte histológico imerso em 0,5ml da solução de marcação. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e mantidas sob agitação permanente (Agitador Sakura – modelo VEM-16, 60 rpm). O controle da reação foi feito a cada 30 minutos observando-se em uma amostra a marcação da neurópila e dos neurônios com auxílio de microscópio óptico (Olympus modelo BH2), sendo a visualização de dendrito

terciários o



critério

empregado para interrupção da reação, em média após 4 horas. O bloqueio da reação foi feito com lavagens, 3 x 15 minutos, em tampão TRIS 0,1 M –

pH 8,0, sendo os cortes removidos das placas e montados em lâminas histológicas albuminizadas. Após a secagem em estufa (Sakura – modelo PM-400) por 24 horas os cortes foram recobertos com Entelan[®] e lamínula (**Figura 4**)

Figura 4: Fotomicrografia do corpo celular de um neurônio NADPH-d (400x)

3.3.5 Análise Microscópica e Morfométrica

Os critérios utilizados na seleção dos cortes histológicos para as análises morfológicas foram a integridade do corte histológico, a boa marcação da NADPH-d na neurópila e nas células, a coloração homogênea pelo cresil violeta e o reconhecimento dos limites do córtex através de comparação com um atlas estereotático (PAXINOS e WATSON, 1998). Após a seleção dos cortes histológicos foram executadas as seguintes medidas:

1. Área e perímetro do soma dos neurônios NADPH-d +;
2. Número e extensão dos prolongamentos primários dos neurônios NADPH-d +; e
3. Densidade neuronal nas camadas corticais, das células coradas pelo Cresil Violeta e pela NADPH-diaforase.

Para a análise microscópica dos cortes histológicos e para a captura das imagens foi feito estudo convencional utilizando-se microscópio óptico (Opton) com câmera digital acoplada- Moticam 1000, 1,3 MP, USB 2.0 a qual gerava a imagem digitalizada no software analisador de imagens - Motic Images Plus 2.0ML.

Para cada lâmina (Nissl e NADPH-d +), foram analisados 6 campos, 3 de cada hemisfério cerebral, com aumento de 40x para Nissl e 10x na NADPH-d+. Após a obtenção das fotografias (Moticam), foi realizado o estudo morfométrico, avaliando-se a densidade neuronal nas camadas corticais (coloração Nissl – Figura 3 e NADPH-diaforase- Figura 5) de cada hemisfério cerebral executando-se a contagem automática dos neurônios através do aplicativo Mesurin_pro[®], esse aplicativo permite que seja contada a quantidade de células por áreas das diferentes camadas de forma concomitante. Obtendo-se a densidade, definida como o número de células/área em μm^2 (figura 3) As médias das densidades de cada corte histológico foram tomadas para efeito comparativo e estudo estatístico.

Para a avaliação da área e perímetro do soma, número e extensão dos prolongamentos primários neuronais, utilizou-se lâminas coradas em NADPH-d +, com aumento de 40x. Fotografias foram obtidas através de uma câmera fotográfica Moticam (1000, 1,3 MP, USB 2.0) acoplada ao microscópio óptico (Opton), a qual gerava a imagem digitalizada no software analisador de imagens - Motic Images Plus 2.0ML onde foram armazenadas e posteriormente analisadas. Este aplicativo, utilizado para medidas bidimensionais, permite que se circunde uma figura, p.ex. o corpo celular, com um cursor obtendo-se automaticamente sua área e perímetro, da mesma maneira é possível, utilizando-se a mesma metodologia, medir o comprimento de um prolongamento (Figura 6).

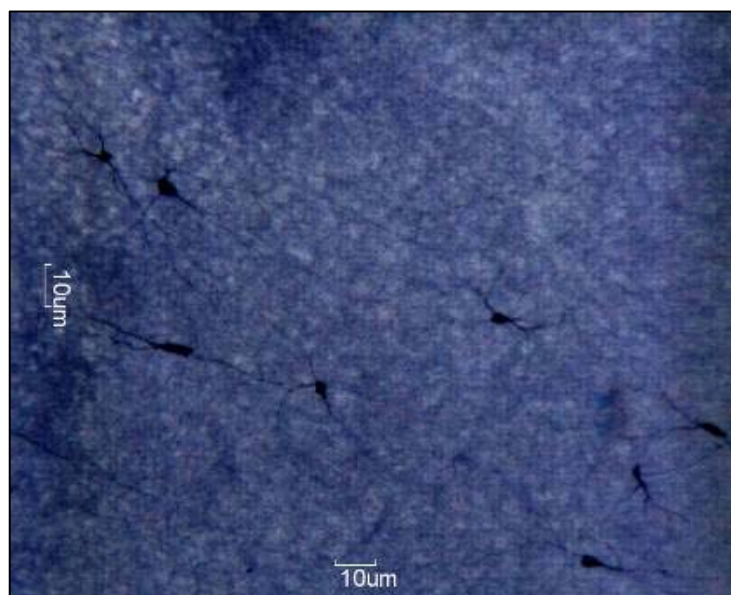


Figura 5- Fotomicrografia das células neuronais marcadas pela NADPH-d (100x)

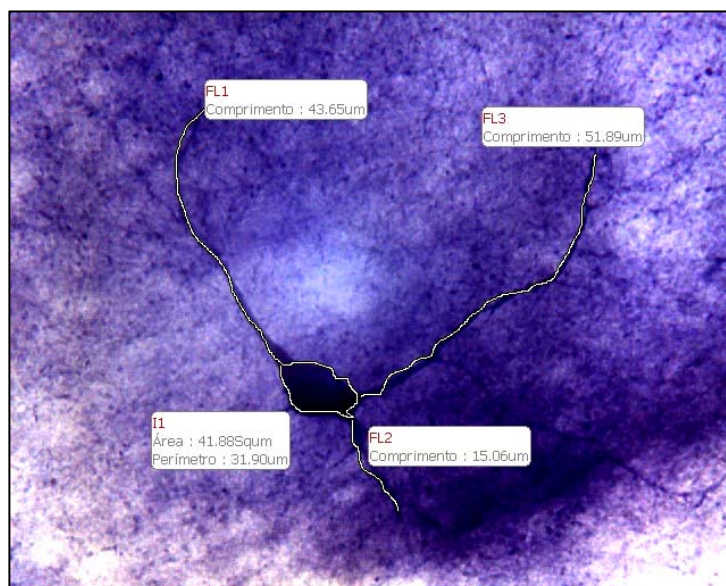


Figura 6 – Morfometria da área do soma e dos prolongamentos de um neurônio NADPH-d (400x)

3.4 Análise Estatística

Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 para Windows e o Excel 2003. Utilizou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para as variáveis quantitativas, e para verificar as diferenças entre as médias o ANOVA - One Way (Distribuição Normal) e Kruskal Wallis (Distribuição Não-Normal). Para as comparações múltiplas utilizou-se o Post Hoc com o

método de Tukey, Mann-Wihtney, Spjotvoll e Stoline. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança (nível de significância de 5% - $p < 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

ARTIGO ORIGINAL: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DIGITAL DE NEURÔNIOS NADPH-DIAFORASE DO CÓRTEX VISUAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO E À DESNUTRIÇÃO PERINATAL

Submetido para publicação como artigo original na Revista Brain Research. Apresentado segundo as normas do periódico que estão em anexo.



Original Article

Morphometric analysis of neurons NADPH-diaphorase in the visual cortex of animals exposed to perinatal malnutrition and alcoholism

Mariana Lúcia Correia Ramos Costa^{1*}, Nicodemos Teles de Pontes-Filho², Emídio Cavalcanti de Albuquerque³

¹Post-graduate Program in Patology at Federal University of Pernambuco (UFPE), ²Prof^o Departament of Patology - UFPE, ³Statistical Institute of Integrative Medicine - Professor Fernando Figueira/IMIP - PE

* Corresponding author: Mariana Lúcia Correia Ramos Costa, Post-graduate Program in Patology at Federal University of Pernambuco State (UFPE). University City, S/N. Recife-Pernambuco, Brazil. CEP: 50.670-901. Phone: +55.81.21268529. Fax: +55.81.21268529. E-mail address: mariana_dlm@yahoo.com.br

Abstract

It is known that ethanol and malnutrition can produce various effects in the Central Nervous System, such as microcephaly, mental retardation, motor dysfunction and cognitive impairment, however, the mechanisms that induce these changes are still remain unknown or little understood. Based in these reports, the present study evaluated through morphometrics parameters the malnutrition and ethanol effects over the area and perimeter of the cell body, the number and length of the primary extensions of Neurouns NADPH-diaphorase and the neuronal density in cortical layers of the brain. For both, it was studied the cerebral visual cortex zone of Wistar male rats, with 40 days age, generated and suckled by dams submitted to multicarencial dietary (8% protein) and alcohol administration (commercial aguardente or ethanol PA). The animals were distributed in six experimental groups according to the treatment (N, M, NA, MA, NE e ME). The brain histological slices were stained by Nissl and processed for Neurouns NADPH-diaphorase histochemistry methods. It was showed morphological pattern modifications of rats visual cortex; observing that: a) the malnutrition doesn't influenced the neuronal density, but reduced the Neurouns NADPH-diaphorase positives neurons extensions density, area, perimeter, length and number; b) the isolated or malnutrition associated alcohol treatment influenced on neuronal density as well as, the Neurouns NADPH-diaphorase neurons extensions density, area, perimeter and length, but it didn't influence the length number. Concluded that the alcohol and malnutrition influenced the young rats visual cortex morphological profile during the perinatal development.

Descriptors: ethanol, malnutrition, perinatal, cerebral cortex, visual cortex.

1 Introduction

Alcohol is a psychoactive drug most consumed worldwide and it constitute a social problem due to its multiplicity and toxic actions for the human body, mainly in the nervous system and it is often associated with morphological and functional disturbance and consequent social economic problems (Crabe, 2001; Lieber, 2000, Guerrini, 2007).

The ethanol is a simple molecule and absorbed by the gastrointestinal tract and less than 10% is eliminated by the lungs and kidneys and the remained oxidized by the body and freely

crosses the placental barrier, reach higher blood concentrations in the fetus than the mother. The toxic effect on the fetus is therefore more exacerbated, for not having fully developed liver function (Brody, 1998; Gil-Martín, 1996; Streissguth, 1980).

The Central Nervous System (CNS) seems to be more susceptible to the effects of ethanol, causing a number of important cellular dysfunction and histological brain development, with consequent changes morphofunctional offspring (Özer, 2000). In steps of cell differentiation is observed blockade of receptors for neurotransmitters, interference in the process of myelination and axonal and dendritic modeling. Dendritic abnormalities represent a consistent anatomic correlation with mental retardation. (KAUFMANN, 2000).

The brain increases, in a particularly rapid stage defined as "critical period of brain growth" ("brain growth spurt"), that is, where is the peak of activity of neuro-gliogenesis, migration and differentiation. During this period, there is greater vulnerability to neural nutritional changes and other factors arising from environmental stimuli (Dobbing, 1968; Guedes, 2004). Furthermore, consumption of alcohol can cause nutritional deficiency, by reducing the absorption of nutrients depending on the toxic action of ethanol in the intestinal epithelium, or even be the result of malnutrition in uterus by interfering with hepatic metabolism of nutrients (Lieber, 2004). Therefore, alcohol can cause either primary malnutrition or secondary malnutrition, being responsible for malabsorption and cellular injury caused by direct cytotoxicity (Araújo, 2005).

In particular, the visual cortex seems to be more sensitive and can easily suffer from morphological changes when subjected to premature malnutrition and therefore it has been subject of several experimental studies (Borba et al., 2000; Picanco-Diniz et al. 1998; Rocha-de - Melo et al., 2004). Throughout the cerebral cortex is possible to observe the Neurons NADPH-diaphorase (Nitric Oxide producers - NO) at birth (Yan et al., 1994). The Neurons NADPH-diaphorase histochemistry reveals the distribution of nitric oxide synthase (NOS) in fixed tissue (France, 1997). Thus, although there are several reports of morphofunctional changes caused by ethanol and malnutrition is poorly known and is found in the literature regarding the interaction brandy-malnutrition, or isolated effect of this drink on the morphology of Neurons NADPH-diaphorase neurons in the cortex visual rats.

In Brazil, in the north and northeast there is a higher prevalence of alcohol dependence (9.2 and 9.3% respectively) (Pechansky, 2004), especially the frequent use of aguardente (brandy), beverage high alcohol content (42%) by low-income population is usually associated with diet multicarencial which can favor the toxic effects of ethanol (Pontes-Filho, 2003). Therefore, our objective was to evaluate, through histochemical study, the effects of brandy and malnutrition on the morphology of Neurons NADPH-diaphorase in the visual cortex of rats during perinatal development.

2 Results

2.1 Brain Weight

Mean values of brain weight (40 days old) are shown in Graphic 1. The analysis showed no significant difference between groups A and E when compared to the nourished group (N), or when compared together. Regarding malnutrition observed a significant difference only between groups M and ME. On the other hand, comparison between groups

with the same treatment, but with different diets, in the other words, A x MA e E x ME, showed that the weight difference was significant. Finally, the M group had lower brain weight compared to N group.

2.2 Neuronal density of cortical layers - Nissl

The statistical analysis was used to assess the effect on the number of neurons labeled with Nissl. Although the M group is shown numerically higher, no statistical difference when compared with N group. The post-hoc showed significant difference between group N-Nourished and groups E and A, or when they were compared, with higher cell density in group A. Among the malnourished, it was found that the M group showed a statistical difference when compared with MA, with lower density in the latter. When comparing the groups with the same diet and different ME treatments x MA x A and E was found statistically significant differences between them. Group A showed greater cell density and lower MA group (**Graphic 2**).

2.3 Density of NADPH-diaphorase neurons

Evaluating the nutritional condition in isolation on the number of labeled neurons was observed significant difference between groups N and M, with higher density of Neurons NADPH-diaphorase in nourished. The N group showed a statistical difference when compared with group E, however, was not significant when compared with group A. Among the malnourished, there was statistical difference between group M and the MA group, with the latter, higher density. There was no significant difference between Groups M and ME. When comparing the groups with the same diet and different ME treatments x MA x A and E was found statistically significant differences between them, with higher cell density groups A and MA (**Graphic 3**).

2.4 Perimeter of NADPH-diaphorase neurons

In the study of the perimeter of the NADPH-d neurons, the N group showed a significant difference compared to group M, being higher in group N. Among the nourished, it was found statistical difference between the N and E, the greater circumference of the first group. Comparing the malnourished group, statistical difference between M and MA, with higher perimeter group M. When comparing the groups with the same diet and different treatments ME and MA, with the largest perimeter ME group, however, between the E x A the difference was not statistically significant (**Graphic 4**).

2.5 Area of NADPH-diaphorase neurons

The area of the body of NADPH-d neurons was showed significantly higher in group N compared to group M. The group N also differed significantly from groups E and A, with higher total cell area. Among the malnourished, no differences were statistically significant. When comparing the groups with the same diet and treatments different between MA and ME x E x not found a statistically significant difference between them (**Graphic 4**).

2.6 Extension of the extensions of the NADPH-d neurons

The statistical results showed significant difference between group N and group M, where the group N had a higher average length of extensions. The N group was also statistically different from groups E and A, where the largest extensions in the aguardente group. The same comparison made between the malnourished revealed no significant differences. When comparing the groups with the same diet and different treatments ME x MA, no significant differences between them, however there was no difference between groups E and A, being higher in the latter group (**Graphic 5**).

2.7 Number of primary extensions of NADPH-d neurons

After the Kruskal-Wallis test there was no difference between groups. When the Mann – Whitney test was accomplished, statistically significant difference between groups N and M, the nourished group showed the highest mean extensions for primary cell body. (**Graphic 6**).

3 DISCUSSION

3.1 Weight brain

The results in relation to brain weight showed a strong influence of malnutrition, since just the animals in groups treated malnourished and malnourished group were different from control. Protein malnutrition produces a reduction of brain tissue accompanied by an increase of glial proteins in different brain structures, such as the cortex, hippocampus and cerebellum (Feola, 2008). Ethanol can also alter intracellular mechanisms that modify the growth, differentiation and survival of cells in the cerebral cortex (Climent et al., 2002). Othman et al. (2002) suggested that consumption of milk, associated with 15% ethanol causes a reduction in body weight and brain, and receptors, RNA and protein density in the cortex and cerebellum.

Microcephaly in clinical alcoholism (Rosenberg, 1996) or experimental (Streissguth et al., 1980), is the main factor to justify the reduction of brain mass. In a similar study, Miller and Potempa (1990) mention the presence of microcephaly in animals with ninety days. According to the authors, microcephaly was due to the reduction of the amount and volume of neurons and neuropil components that would reduce the heavy mass of the cerebral cortex alone. This work was considered the total brain weight, excluding the olfactory bulb, cerebellum and brainstem, this methodological difference may explain the discrepancy between the authors, compared to animals treated and nourished. However there was agreement in relation to treaties malnourished.

In such cases, the results showed significant weight reduction compared to control, indicating the importance of malnutrition as a co-factor that influences the embryonic brain development. This aspect was well evidenced by the observation that the brain weight of malnourished ethanol group (ME) is significantly smaller than the malnourished group (M). Attributes is still probably the caloric supplementation of the brandy that there's no significant

difference in weight between the malnourished aguardente groups (MA) and malnourished (M).

3.1.2 Neuronal Density

The results didn't show significant difference between groups N and M, compared with the average number of neuronal cells, corroborating findings of Guedes (2009). Animals nourished diet multicarencial had higher numbers of cells that nourished group (normal nourished), although this difference was not statistically significant. So, this apparent increase in cell number appears to be due to the loss of extracellular matrix and water experienced by the brain in a mechanism described as "packaging" brain. The packaging of the brain determined by reducing the cellular components and neuropil than approaching the remaining cells give the false image of a larger number (Borba et al., 2000, and Picanco-Diniz, 1998).

According Gambetti et al. (1974) and Morgane et al. (1978), in the brain malnutrition, the highest density results from the pooling of brain cellular elements in a more compressed because there is less myelin between them. Although in smaller size and number of such elements are closer to each other, compared to normal- nourished, causing an apparent increase in cell density. This reduction in volume and abnormal organization of the cortex results in microcephaly found in alcoholism and fetal malnutrition (Picanco-Diniz et al, 1998 and Borba et al, 2000).

It should take into account another important phenomenon that occurs during development in vital systems, for example, in the CNS as protection and / or adaptation of these organs in the face of adversity, in which the brain is probably spared at the expense of other systems. This fact, classically reported by Winick and Noble (1966) shows that protective mechanisms come into play to save the brain's aggression nutrition in relation to other organs. Thus, in response to malnutrition, brain weight, for example, is less affected than any other organ; it is checked when calculating the weight of the brain as a proportion of body weight (Winick and Noble, 1966).

According Morgane et al., (2002) in malnourished animals during lactation, decreasing the weight of the brain and cerebellum and decreased neural protein biosynthesis, but comparably less than the decline that occurred in other organs.

All nutrients have an influence on brain maturation. However, the protein appears to be the most important component to interfere with the rapid growth of the brain, as well as for the development of structures and neural functions (Morgane, 1993). Thus, the synthesis of structural proteins, growth, functional organization and the production of brain neurotransmitters depend on the supply of essential amino acids contained in protein diet (Santos-Miller, 2002).

Our results also showed statistically significant difference between groups nourished ethanol and nourished brandy in relation to N, as well as among themselves. Introducing the group A greater number of cells, showing that there was influence of the treatments (ethanol and brandy) associated with normal nutrition (normal-nourished) on the neuronal density. In addition to factors previously explained to a greater or equal to the apparent number of cells that the malnourished group and the treated groups showed, compared to nourished, it is

suggested to assign to the caloric supplementation of the brandy during lactation, the apparent greater number of cells (neuronal density).

The brandy (aguardente), which is composed of different alcohols and especially artificially sweetened, would support a calorie, no nutrition, the greater the lactating rats, unlike ethanol which offers empty calories (Pontes-Filho, 2003). Therefore, this support caloric added to nutrition normoprotein of the group appeared to influence the mechanism of brain plasticity, with recovery of neuronal cells. Findings like these can theoretically support the concept established in spite of brain plasticity proposed by Hebb in 1949, quoted by Rosenzweig and Bennett (1996). The increase in weight and thickness of cortical and subcortical structures in the neuronal activity of enzymes in capillary number and diameter of cortical neuronal density and increased number of synaptic contacts and dendritic branches found in these animals also shows neural plasticity, when compared animals raised in environments with "poor" stimuli. Such changes caused by environmental manipulation, are best evidenced when it is imposed during the early stages of life, since the brain tissue is more susceptible to changes (Rosenzweig, 1996; Fernandez, 1993; Diamond, 1967; Sirevaag, 1988).

However, studies indicate that stimulation (sensory or affective) is not sufficient by itself to obtain the neuronal plasticity, requiring also the concomitant nutritional rehabilitation (Santos-Miller, 2002). Thus, it is believed that the support offered by caloric brandy added to the nutritional status might be normal-caloric and normal to favor brain plasticity during the critical period of greater vulnerability and the development of this organ, contributing to a higher neuronal density in the brandy group.

Supporting this hypothesis, our results, corroborating with the Pontes-Filho (2003) showed a smaller number of cells in the MA group compared with groups N and M, demonstrating the important influence of nutritional condition in the mechanisms of brain development since even with the support of caloric brandy, this was not enough to promote the adaptation cerebral probably the lack of adequate nutrition. It is likely that the association of brandy with malnutrition interferes with CNS development.

Silva (2006) reported the increased presence of micronuclei and the accumulation of substances indicative of cellular stress, such as glycosaminoglycans in cells of the cerebral cortex of animals treated with brandy neurotoxicity. Therefore, it is suggested that brandy could have influenced in neuronogenesis, cell migration and exocytosis.

Interestingly, when comparing the malnourished group together, there was no statistical difference between M and ME, so we can infer that there was no effect of ethanol associated with malnutrition in neuronal density.

When Heaton et al., (2003), was working with newborn mice with acute ethanol exposure suggested that the CNS appears to be relatively resistant to damage mediated by ethanol, over short periods of late development. According to the authors, differences in baseline expression of regulatory molecules for survival and cell death, stimulated by alcohol, could promote neurotoxicity induced by ethanol during critical periods of early brain development. Subsequently, in late periods trigger mechanisms of resistance or compensation (neural plasticity) to aggression to alcohol and can restart the mitotic cycle and reactivating microneurogenesis gliogenesis late.

3.1.3 Density of NADPH-diaphorase neurons

Statistical analysis showed that the nutritional status of groups (nourished and malnourished), alone, affected all parameters related to NADPH-d neurons.

When we analyzed the nutritional condition in isolation on the number of NADPH-d, we observed that the D group showed fewer of these cells compared to the group N. These results differ from those of Pontes-Filho (2003) and Borba (1998), they found a greater number of NADPH-d neurons in the malnourished group. The difference in the results obtained in this work with the Pontes-Filho (2003) may be due to divergent morphometric procedure (software for capturing and analyzing the images and the selection criteria). Already a disagreement with the results of Borba (1998), and the divergent morphometric methodology, the author used in his work, a diet with protein quantitatively normal (18% protein) in the malnourished group, whereas in the present study, the malnourished group received during the experiment multicarencial a diet containing 8% protein. This methodological divergence seem to be relevant, since it knows the importance of proteins in normal development and organization of the CNS.

Borba (1998) in his study about the influence of malnutrition in these cells found a higher density of them in the white area 17, speculating that there was delay in the neuronal migration of NADPH-d neurons. What may have occurred in the present study, thus having fewer NADPH-d cells in the visual cortex of group D compared to nourished group.

When Debassio and Kemper (1985) studied the effects of protein malnutrition in neuronal migration, they found that rate reduction (fewer cells) to the olfactory bulb in rats malnourished, compared with their respective controls.

During development, the process of overproduction of neurons followed by drastic reduction of these cells, occurs in almost all regions of central and peripheral nervous system and is commonly referred to as programmed neuronal death (Morgane et al., 1993). Evidence indicates that this process occurs with the NADPH-d neurons. Therefore our results in the malnourished group the protein deficiency may have influenced the programmed cell death by presenting a lower density of NADPH-d neurons. Kimura and Baughman (1997) showed that the number of neurons, presumably NADPH-d declines substantially after birth.

The B group showed a higher number of NADPH-d neurons, compared to E, no differences with N. Among the malnourished group MB also showed a greater number of NADPH-d neurons. Probably the caloric support offered by the commercial drink might have favored the survival and resistance of such cells during development, unlike ethanol which offers empty calories, as mentioned previously.

Silva (2006) found increased numbers of cells PAS + in cerebral cortex of rats submitted to perinatal brandy, but this increase was found to be disorganized in the neuropil with a random distribution throughout the cortex, indicating that the migration period the action of brandy in the development of neuropil was more pronounced.

The divergence between the density and neuronal density of NADPH-d neurons can be justified, since the histochemical technique for NADPH-d is restricted to mark a small neuronal population that is approximately 1 to 2% of all cortical neurons (Snyder, 1992). NADPH-diaphorase cells represent a special population of neurons in the neocortex of the rat,

showing a model different of development (France, 1997). So possibly not interfere in the total neuronal density (Bridges - Son, 2003).

Differential effects in distinct germline stem areas, two types of neuronal populations (Miller and Potempa, 1990), support the hypothesis that there is a "window of vulnerability" to brain regions and specific neuronal populations (Mooney et al., 1996).

No statistically significant difference was found between groups M and ME, possibly due to the ethanol tolerance, as the work of Chandler (1994) showed that chronic exposure to ethanol showed an increased level of NO in neuronal cultures and may be responsible the acquisition of tolerance to alcohol, triggering further, mechanisms of resistance to aggression to alcohol.

It is speculated that the level of nNOS (neuronal nitric oxide synthase-) may have a neuroprotective role against microcephaly and ethanol-induced toxicity in developing rat brain, and its deficiency has been linked to worsening of microcephaly and neuronal loss in developing rats (Evrard, 2003).

Furthermore, several authors suggest that malnutrition, alone, can promote neuroanatomic changes (Brock and Prasad, 1992; Diaz-Cintra et al., 1990), biochemical (Chen et al., 1992, Marin et al., 1995) and electrophysiological (Guedes et al., 1992) during development of the nervous system. Reported in neuronal migration disorders lead to a variety of congenital malformations. The complexity and multiplicity of mechanisms involved probably consider the clinical - radiological and the genetic heterogeneity observed in neuronal migration disorders (Gressens, 2000).

3.1.4 Area and perimeter of NADPH-d neurons

When observing the influence of nutritional condition singly, it is observed that there was a statistically significant difference between the nourished groups compared with their malnourished group, the latter showing a smaller area and perimeter neuronal soma. These data, while safeguarding the methodological limits used here, suggest that malnutrition is likely influenced by the cell volume decrease in cellular metabolism, consistent with findings Picanco-Diniz et al., (1998), Borba et al., (2000) Borba and (1998) and conflicting with the data obtained by Pontes-Filho (2003) and Guendler (2008).

Diaz-Cintra et al. (1990) and Garcia Ruiz et al. (1993) were studying the size of the axes and the perimeter of the soma of pyramidal cells in rats subjected to chronic malnutrition with casein 8% and 6% respectively verified that the effect of the diets did not appear on these parameters to 30 days, but reduced to 220 days of life compared with their controls. It is indicating a probable resistance of the cell body to low-protein diet based on casein (protein of high biological value), but not to diets deficient in essential amino acids, such as the POV (vegetable protein), used by Borba (1998) and diet multicarencial (8% protein) used in this study. Likewise, Guendler (2008) analyzing morphometrically the area of the cell body of neurons in the motor cortex on the 24th Day of life, there was a larger area of the sum in the malnourished group when compared to nourished, this fact confirms the findings set out above, since the author uses up to 8% casein to play malnutrition.

Therefore, based on these observations we can conclude that the effects of malnutrition in early life on the development and brain function can not be completely

avoided if the malnutrition is supplemented only with proteins of low biological value (Guedes, 2008) as with that used in the diet multicarencial.

Another factor that possibly contributes to the theory of the influence of nutritional status on the area of the cell body of neurons NADPH-d was demonstrated by Araújo (1998), when he observe increasing this parameter after nutritional recovery reversing the effect promoted by protein malnutrition in chronic imposed early life in young rats. In contrast, Borba (1998) says that these neurons are sensitive to chronic malnutrition imposed early in life and that even after nutritional recovery these changes may persist.

The results also demonstrate the influence of ethanol associated with normal nutrition on the perimeter and area of body neuronal. But the group brandy statistical difference in the value of the perimeter, when associated with malnutrition, and in relation to the area, when associated with normal nutrition compared to their respective groups. Thus, it is believed that there was influence of the components of brandy (and sugar alcohols) on neuronal cell metabolism, and sugar of greater brandy apparent action, when associated with normal protein nutrition.

The variations in the behavior of the parameters area and perimeter suggest that the metabolism of these cells can be affected both by intrinsic and by extrinsic factors (malnutrition, environmental stress), more difficult, thus the clarification of the mechanisms by which alcohol (ethanol and brandy) interfere with normal sensorimotor development that result in changes found in the Fetal Alcohol Syndrome (FAS).

Therefore, measurement of the area represents a challenge for the study of tissue morphology, since this parameter is influenced by the "dynamic moment" at the time of sampling (Pontes-Filho, 2003).

Picanco-Diniz et al. (1998) and Borba et al. (2000) suggested that neurons can change their area as the stimulus received at a particular time and may subsequently return to its condition as "normal," this means that the variation the cell area may represent a transient modification. In fact, before stimulation, physiological or not, a tissue may show different patterns that are reflected in the number of its cells, like those in the area. Whereas conditions are adaptive, it is assumed that the measure cell is directly correlated to the time of cell metabolism. (Pontes-Filho, 2003).

3.1.5 Size and number of extensions in NADPH-d neurons

For the brain to function properly as an adult, it is essential to proper development in early life. In albino rats the phase in which embryogenesis occurs is the first three weeks of postnatal life, in others words, the period of lactation. During this period the brain is more vulnerable to environmental aggressions including nutrition, since this phase is related to the "period of rapid growth" of the brain. This process includes the hyperplasia and cellular hypertrophy, myelination and organization of synapses (Guedes, 2008). Thus, protein deficiency can cause deleterious effects directly into the brain, such as decreased brain weight (Pontes-Filho, 2003, Rotta, 2003, Santos 2000), reduced volume and changes in the hippocampal formation (Morgane, 2002; Ranade, 2008) and further injury in neurotransmitter systems (Palmer, 2004).

In this study, nutritional status alone showed influence on the extent and number of extensions neural in the nourished and malnourished groups. Similar studies performed by Borba (1998) showed that the distribution of dendritic segments of the malnourished animals showed a reduction in the number of branches of 5th order and Fernandez et al. (1993) showed that in pyramidal neurons of the motor cortex of nourished animals and malnourished reared in impoverished environmental conditions, there was significant reduction in the length and number of dendrites of higher orders, indicating a reduction in the areas of receptive field, suggesting that the development of connections of pyramidal neurons in the motor cortex might be impaired.

This reduction in the number of extensions in the malnourished group, confirms previous findings that the visual cortex is very sensitive to the effects of malnutrition (Diaz-Cintra et al. 1990; Morgane et al., 1978) and that the efficacy of synaptic contacts mediated by nitric oxide in the developing nervous system could be adversely affected (Yan et al., 1994). Malnutrition, according Morgane et al. (1992), leads to alterations in neuronal maturation processes such as reduction in the development of dendritic, synaptic and myelination. It is possible that the lack of protein and essential amino acids in the diet may have caused changes in dendritic structure of NADPH-d (Borba, 1998).

The deficiency of one or more nutrients in the daily diet can certainly disrupt the structural organization (histology) and one or more biochemical processes of neural development, it takes to, generally, impact on their functions (Guedes, 2008). Likewise, ethanol caused a reduction in the size of neuronal extensions even when associated with normal protein nutrition. Costa and Guizzetti (2002) reported that ethanol exposure during development reveals a decrease in the number of synapses per unit area of the brain tissue and morphometric analysis of hippocampal neurons (in vitro) showed that ethanol exposure decreases the number of synapses per dendrite by inhibiting the size of the dendritic tree and reduce the number and branching of dendrites in various brain areas of rodents.

Alcohol exposure and post-natal affect ion channels and neurotransmitter receptors in the hippocampus suggesting that these effects may be involved in the etiology of neuropsychiatric disorders in alcoholic and FAS (Costa et al., 2000).

Interestingly the group A has the largest size of its extensions when compared with nourished once again believe that the sugar in brandy influenced only when associated with normal protein nutrition, the lengthening of dendritic projections indicate the possibility of local trophic responses needed to maintain neurons alive and functioning (Grinfeld, 2004).

Jobs Borba (1998) indicate that between 30-40 days the expression of NADPH-diaphorase activity in the dendritic tree of these neurons appear to be the standard adult set. Moreover, studies by Araújo (1998) demonstrated that the reduction of dendritic field of NADPH-d disappears in adult mice recovered by the correction of nutritional deficit. Thus, the synthesis of structural proteins, growth, functional organization and the production of brain neurotransmitters depend on the availability of essential amino acids contained in protein diets (Morgane, 1978). Thus, it is believed to have occurred in the groups submitted to treatment, events related to brain plasticity, since the animals of this study showed no differences regarding the number of extensions when compared.

Fernandez (1993) and Kaad (1991) reported that animals submitted during the development of an environment "rich" in stimulation demonstrated increase of brain amines in the activity of enzymes in neuronal number and diameter of cortical capillaries, increasing the number of synaptic contacts and dendritic branching, indicating synaptic plasticity. These alterations are well evidenced when imposed during the early stages of life, once the tissue is more susceptible to changes.

The body's response to alcohol intake is highly variable (Lieber, 1994), depending on the dose, concentration and distribution of drinking in the blood as well as individual variations in the capacity of metabolism related to sex, age, race, genetic (Thomas et al., 2000), nutritional status, parallel use of medications and the presence or absence of pathology (Dantas, 1983).

Therefore, on the proposed experimental protocol and results we can conclude that malnutrition alone had influence on the morphometric parameters of neurons in the visual cortex of rats during the perinatal development, and brain weight. Regarding the effect of brandy is concluded that when combined with normal nutrition (Labina) influenced the neuronal density, and for NADPH-d affected the area and extent of extra time, but not statistically affect the density, perimeter and number of extensions. Analyzing the brandy in combination with malnutrition (multicarencial diet) that interfered with the neuronal density (Nissl) and perimeter density of NADPH-d, but did not interfere in the area, size and number of extensions of NADPH-d. Thus, in the end it is suggested that there was interference from the brandy alone or in combination with malnutrition on the various parameters of perinatal brain development. However, due to the limited literature regarding the use of brandy, with or without malnutrition, during the development of the visual cortex, it is necessary to further study and deeper for confirmation of our results.

4 Experimental Procedures

4.1 Analysis of Aguardente (brandy)

The brandy was subjected to analysis of their composition in the Chromatography Laboratory Instrumental - Department of Chemical Engineering - Center for Technology and Geosciences, Federal University of Pernambuco. Certificate of Analysis No.: 007 - A/2002. Type of Analysis: Secondary products with alcohol / brandy.

4.2 Animals

Young male rats (40 days old), from the mating of thirty adult females unrelated, headquarters at 120 days old and middle-weight of 235g, from the vivarium of the Department of Nutrition of the Health Sciences Center / UFPE colony, they were kept in light / dark cycle of 12 hours (light between 7:00 and 19:00 hours) with a temperature of 23 ± 1 ° C and water supply *ad libitum* throughout the experiment.

The experimental protocol developed in this work was submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation / CCB / UFPE (Protocol No. 119/2003).

4.2.1 Mating

For mating were placed in each cage, three females and one male. The pregnancy was confirmed by identification of squamous cells, mucus and gestational sperm on microscopic examination of vaginal secretions diluted in warm saline solution and examination performed daily for up to three days, in the morning.

4.2.2 Experimental groups

Confirmed the pregnancy, mothers were separated according to the experimental protocol, at most 02 per cage, maintained until the 18th day of gestation. From that period, were transferred to individual cages until the end of lactation (25 days old of the puppies). Between the first day of pregnancy and last lactation, gilts were subjected to one of six protocols, resulting from combination of two nutritional treatments (commercial diet or a diet multicarencial Labina ® (Theodosius, 1990) containing respectively 23% and 8% protein) with three treatments by gavage (daily administration of water, brandys, or ethanol). The offspring of mothers treated in this way originated six experimental groups described below:

NOURISHED (N) (n = 14) - coming from mothers maintained with Labina ® and receiving by gavage doses of 3.8 ml of filtered water.

NOURISHED BRANDY (B) (n = 10) - sired by mothers nourished Labin ® and receiving by gavage, 3.8 ml of brandy commercial in nature (**ANNEX E**);

NOURISHED ETANOL (E) (n=15) – Sired by mothers maintained with Labin ® and received ethanol by gavage at a dose of 3g/kg body weight, diluted in filtered water, at a total volume of 3.8 ml (Ethyl Alcohol Absolute PA - VETECO ®)

MALNOURISHED (M) (n = 14) - to mothers maintained with diet and getting multicarencial by gavage, 3.8 ml of filtered water;

MALNOURISHED BRANDY (MB) (n = 16) - generated by headquarters fed with diet multicarencial and receiving by gavage, 3.8 ml of brandy

MALNOURISHED ETHANOL (ME) (n = 15) - generated by headquarters fed with diet multicarencial and receiving by gavage, 3.8 ml of ethanol

On the third day after birth, the sexing was performed excluding the females, due to the known influence of female sex hormones on alcohol metabolism. The male pups from each experimental group, generated by different mothers, were intermixed and kept in litters from 4 to 6 animals. Standardization of litter sizes aimed to eliminate malnutrition induced by large litters during lactation.

After weaning, the administration of substances by gavage was suspended and the pups were kept with the diet of the experimental group until the day of infusion (40 days).

4.3 Perfusion

At 40 days old, pups were weighed and anesthetized with intraperitoneal and aqueous solution containing a mixture of 10% Urethane (1 g / kg) and Chloralose to 0.4% (40mg/kg), according to body weight. To implement the infusion proceeded to wide opening of the chest

to the heart. Injected with 0.1 ml of heparin (Liquemine ®) in the left ventricle in the same region was introduced a cannula of polyethylene and concurrently became the opening of the right atrium, and the infusion solutions and blood removed through this opening. For removal of blood and maintenance of tissue integrity is injected through the cannula, a volume of around 100 to 150 ml of buffer solution of 0.1 M sodium phosphate, pH 7.2-7.4 (PBS) containing 0, 9 per volume of NaCl. Then perfuse a volume around 150 to 300 ml of 10% formaldehyde diluted in PBS 0.9%, controlling for the fixation of tissue by the volume inoculated and rigidity of the head and upper limbs.

4.4 Weight and Brain microtomy

After infusion, the opening of the skull was preformed; the brain was removed excluding the olfactory bulb, cranial nerves, cerebellum and brainstem, being weighed using analytical balance. The microtome was always performed between 12 and 24 hours of infusion. In the time before the microtome, the brain was divided into 3 parts, by two coronal sections using knife to microtome and stereomicroscope with a millimetric ocular (Olympus, model TGHM), yielding three fragments that were later called, medium and anterior. The posterior fragment corresponded to the posterior brain region, the portion going toward lambda and the cerebellum up to 5.5 mm toward the anterior region of the brain (Paxinos and Watson, 1998). This procedure was adopted to obtain serial coronal histological sections of the posterior cortex (posterior fragment).

4.5 Procedure histochemical and morphometric

For marking of NADPH-diaphorase histochemistry, using a vibratome (Microslice DSK - Dosaka EM CO. LTD Model DKT 3000 W), got up the first four serial histological sections with a thickness of 150µm for both the anterior cortex much later. All sections were immediately immersed in 0.1 M phosphate buffer, washed three consecutive times, 15 minutes each in 0.1 M TRIS - pH 8.0 and stored in the refrigerator until the beginning of the histochemical reaction, which is executed immediately after the microtome. We used the indirect method of malic enzyme (Scherer - Singler et al., 1983) for marking the cells histochemical NADPH-diaphorase. Next, the remaining fragments were placed in 10% formaldehyde diluted in 0.9% saline for 48 hours, subjected to routine histology and embedded in paraffin. After, the microtome (Yamato Koki Microtome, horizontal model) was executed, getting the first four serial histological sections of each fragment, with a thickness of 4mm, which were stained by the acetic cresyl violet (Nissl staining).

For each slide (Nissl and NADPH-d) were analyzed 6 fields, 3 of each brain hemisphere, up to 40x and 10x in Nissl NADPH-d. After obtaining the photos (Motic) was performed for morphometric study, evaluating the neuronal density in cortical layers (Nissl staining and NADPH-diaphorase) in each brain hemisphere by running the automatic counting of neurons through the application Mesurin_pro ®. Obtaining the density, defined as the number of cells / area in nm². The mean densities of each histological section were taken for comparison and statistical analysis.

For the evaluation of the area and perimeter of the body cell, number and length of primary neuronal extensions, it was used in stained NADPH-d, an increase of 40 x. Photographs were obtained using a Motic camera (1000, 1.3 MP, USB 2.0) coupled to an optical microscope (Opton), which generated the scanned image in image analysis software - Motic Images Plus 2.0ml where they were stored and later analyzed.

4.6 Statistical Analysis

It was used the SPSS 13.0 software for Windows and Excel 2003. We used the normality test of Kolmogorov-Smirnov test for quantitative variables. After the normality test, ANOVA was used unilateral ("One Way") to detect differences between means. To find the differences between groups (multiple comparisons) were used the Post Hoc Tukey's method, with Spjotvoll Stoline method. For the results with non-normal distribution was used the Kruskal Wallis and Mann later - Wihtney. For all tests, it was considered as significance level for rejection of the null value of $p < 0.05$.

Acknowledgments

We acknowledge the financial support from Brazilian agency FACEPE / PE.

REFERENCES

ARAÚJO, J. A., 2005. Estudo histomorfométrico do córtex visual de ratos expostos ao etanol e à aguardente. Monografia (curso de Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; MORAIS, J. O. R.; FERREIRA, N. R.; PENHA-SILVA, N., 2004. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. *Braz J Morphol Sci.* 21, 97-101.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; RODRIGUES H. G.; NERES A.C.; FONSECA L. C.; PENHA-SILVA N., 2006. Estudo imunohistoquímico do bulbo olfatório de ratos wistar submetidos à exposição pré-natal aguda com etanol. *Biosci J.* 22, 99-105.

BORBA, J. M. C., 1998. Organização morfofuncional no cérebro do rato desnutrido: análise qualitativa e quantitativa de neurônios NADPH-diaforase positivos no córtex visual primário

de ratos recém-desmamados, submetidos à desnutrição perinatal. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Departamento de Pós- Graduação em Nutrição - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BORBA, J.M.C.; ARAÚJO, M.S.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; GUEDES, R.C.A.,2000. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. *Brain Research Bulletin*, v. 53, 193-201.

BROCK, J.W.; PRASAD, C., 1992. Alterations in dendritic spine density in the rat brain associated rat with protein malnutrition. *Develop Brain Research*, 66: 266-269.

BRODY, T., 1998. Alcohol, In: *Nutritional biochemistry*. 9 ed., Academic Press (London), 201-220.

CHANDLER, L. J.; SUMMERS, C.; CREWS, F.T., 1994. Effects of chronic ethanol exposure on nitric oxide formation in primary neuronal and astroglial cultures. *Research Society on Alcoholism*, 154.

CHEN, J. C; TONKISS, J.; GALLER, J.R.; VOLICER, J., 1992. Perinatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. *J. Nutr.* 122, 2138-2143.

CLIMENT, E.; PASCUAL, M.; RENAU PIQUEIRAS, J.; GUERRI, C.,2002. Ethanol exposure enhances cell death in the developing serie cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its sign pathways. **Journal of Neuroscience on Research**, v.68, n.2,213-225.

CRABE, J.C., 2001. Use of genetic analyses to refine phenotypes related to alcohol tolerance and dependence. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 25,288-292.

DEBÁSSIO, W. A.; KEMPER, T. L., 1985. The effects of protein deprivation on neuronal migration in rats. *Develop Brain Res*, 20, pp.191-196.

DIAMOND, M.C., 1967. Extensive cortical depth measurements and neuron size increases in the cortex of environmentally enriched rats. *J. Comp Neurol*.131,357-364.

DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; ORTEGA, A.; KEMPER, T.; MORGANE, P. J.,1990. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of the visual cortex in rats of three age groups. *The J. of Comp. Neur.* 292,117-126.

DOBBING, J., Vulnerable periods in developing brain. In: DAVIDSON, A.N.; DOBBING,J.; 1968. *Applied Neurochemmistry*. Oxford: Blackwell, 287-316.

EVARD, G. S.; VEGA, D.M.; RAMOS, J. A.; TAGLIAFERRO, P.; BRUSCO,A.,2003. Altered neuron-glia interactions in a low, chronic prenatal ethanol exposure. *Developmental Brain Research*, 147, 119-133.

FEOLI, A.M.; LEITE, M.C.; TRAMONTINA, A.C.; TRAMONTINA, F.; POSSER, T.; RODRIGUES, L.; SWAROWSKY, A.; SANTOS, A.; LEAL, R.B.; GOTTFRI, C.; PERRY, M. L.; GONÇALVES, C.A.,2008. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Res.*, v.187, 33-41.

FERNANDEZ, V.; PASCUAL, R.; RUIZ, S., 1993. Early life environmental deterioration, nutrition and ontogenesis of the motor cortex in the rat: a Golgi study. *Biol Neonate*, 64, 245-253.

FERNANDEZ, V.; BRAVO, H.; SANHUEZA, M.; INZUNZA, O., 1998. NADPH-d positive neurons in the developing somatosensory cortex of the rat: effects of early and late environmental enrichment. *Dev Brain Res*, 107, 299-307.

FRANCA, J. G.; do-NASCIMENTO, J. L. M.; PIKANÇO-DINIZ, C. W.,1997. NADPH-diaphorase activity in area 17 of the squirrel monkey visual cortex: neuropil pattern, cell morphology and laminar distribution. *Braz J Med Biol Res*, 30(9), pp.1093-1105.

GAMBETTI, O.L.A.; IZZUTO, N.N.; SHAFER, B., 1974. Synapses and malnutrition: quantitative ultrastructural study of rat cerebral cortex. *Experimental neurology*, 43,464-473.

GARCIA-RUIZ, M.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; CORKIDI,G.,1993. Effects of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Research*. 625, 203-212.

GIL-MARTÍN, E.; COLADO, I.; FERNÁNDES-LÓPES, A.; FERNÁNDES-BRIERA, A.; CALVO, P.,1996. Effects of acute dose of ethanol on dopaminergic and serotonergic system from rat cerebral cortex and striatum. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.113, n.3, .399-402.

GRESSENS P.,2000. Mechanisms and disturbances of neuronal migration. *Pediatr Rev.*, v.48, 725-730.

GRINFELD, H., 2004. Que efeitos podem ser esperados da exposição pré-natal ao etanol em camundongos prenhes e sua descendência? *Einstein*, 2 (3),187-192.

GUEDES, R. C. A.; ROCHA-de-MELO, A.P.; TEODÓSIO, N. R.,2004. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. *Revista Ciência e Cultura*, 32-36.

GUEDES, R. C. A., 1992. Estudo eletrofisiológico do cérebro em diferentes estados nutricionais associados ao envelhecimento, à estimulação ambiental, ao hipotireoidismo e ao consumo de etanol através do modelo da depressão alastrante cortical.Tese (concurso de Professor Titular – Departamento de Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco,Recife.

GUEDES, G. de M. R., 2009. Efeitos da desnutrição protéica crônica sobre o córtex cerebral e evolução ponderal de ratos adultos. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Departamento de pós- graduação em Patologia - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GUENDLER, J. de A.; BARROS, K. M. F.T de; ALVES, R. M. R.; MELO-JÚNIO, M. R. de; FRANCA, T. J. B. de M.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S.; PONTES-FILHO, N.T de., 2008. Efeitos da natação precoce sobre o córtex motor de ratos desnutridos. *Neurobiologia*,71(3),75-85.

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

HAMMER, R.P., 1986. Alcohol effects on developing neuronal structure. *Alcohol and Brain Development*, 184-203.

HEATON, M. B.; PAIVA, A.; MADORSKY,I.; MAYER, J.; MOORE, D.B.,2003. Effects of ethanol on neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, endogenous antioxidants, and reactive oxygen species in neonatal striatum: relationship to periods of vulnerability. *Developmental Brain Research*, 140, 237-252.

INKONOMIDOU,C.;BITTIGAU,P.;KOCH,C.;GENZ,K.;HOERSTER,F.;FELDERHOFF-MUESER,U.;TENKOVA,T.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J.W., 2001. Neurotransmitters and apoptosis in developing brain. *Biochemical Pharmacology*, 62, 401-405.

KAAD, J. H., 1991. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci.*14, 137-167.

KAUFMANN, W. E., MOSER, H. W., 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex*, v. 10, 981-991.

KIMURA, F.; BAUGGHMAN, R.W.,1997. GABAergic transcallosal neurons in developing rat neocortex. *Eur. Journ of Neuroscin.* 9, 1137-1123.

LIEBER, C.S., 2000. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *Journal of hepatology*, 32, v.1,113-28.

LIEBER, C.S., 2004. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, 34 (1), 9-19.

MARÍN, M.C.; DE TOMÁS, M. E.; SERRES, C.; MERCURI, O., 2007. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate brain development and essential fatty metabolism. *J. Nutr.* 125,1017-1024.

MENELLA, J. A., 1997. Infants' suckling responses to the flavor of alcohol in mother's milk. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21,581-585.

MILLER, M.W.; POTEMPA, G., 1990. Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: effects of prenatal exposure to alcohol. *The Journal of Comparative Neurology*, n.293,92-102.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAS-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, JR.,1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, n.17, 91-128.

MORGANE, O.J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R.,2002. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal formation. *Neurosc. Biobehav. Rev.* v. 26, 471-483.

OGURA, T.; NAKAYAMA, K.; FUJISAWA, H.; ESUMI, H.,1996. Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. *Neuroscience Letters* 204, 89-92.

OTHMAN, T.; LEGARE, D.; SADRI, P.; WAYNE, W.; PARKINSON, F.E.,2002. A preliminary investigation of the effects of maternal ethanol intake during gestation and lactation on brain adenosine A1 receptor expression in rat offspring. *Neurotoxicology and Teratol*, v. 24, n. 2, 275-279.

ÖZER, E.; SARIOGLU, S.; GÜRE, A., 2000. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropath.* 19, n.1, 21-25.

PALMER, A. A., PRINTZ, D.J.,BUTLER,P.D., DULA,W.A.S.C., PRINTZ,M. P., 2004. Prenatal protein deprivation in rats induces changes in prepulse inhibition and NMDA receptor binding. *Brain Res.*,v.996,193-291.

PAXINOS, G.; WATSON, C., 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4 ed. Califórnia USA, Academic Press.

PECHANSKY, F.; SZOBOT, C. M.; SCIVOLETTO, S., 2004. Uso do álcool entre adolescentes: conceitos, características epidemiológicas e fatores etiopatogênicos. Rev Bras Psiquiatr, 26 (Supl I), 14-17.

PICANÇO-DINIZ, C. W.; ARAÚJO, M. C.; BORBA, J. C. M.; GUEDES, R. C. A., 1998. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. Nutritional Neuroscience, 1, 35-48.

PONTES - FILHO, N. T., 2003. - Morfometria e histoquímica do córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao álcool e a desnutrição. Tese (Doutorado em Nutrição)– Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PRAZERES, F. G.; PESSOA, D. C. N. P.; BION, F. M.; ARNAULD, T. M. S., 2004. Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. Rev. Bras. Educ. Fís. Esp., 18, 7-16.

RANADE, S.C.; ROSE, A.; RAO, M.; GALLEGU, J.; GRESSENS, P.; MANI, S., 2008. Different types of nutritional deficiencies affect different domains of spatial memory function checked in a radial arm maze. Neuroscience., v.152, 859-866.

ROCHA- DE- MELO, A. P.; PICANÇO-DINIZ, C. W., BORBA, J. M. C., SANTOS-MONTEIRO, J., GUEDES, R. C. A., 2004. NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. Nutr. Neurosci. 7, 207-216.

ROSEENZWEIG, M. R.; BENNET, E. L., 1996. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav Brain Res, 78, 57-65.

ROSENBERG, A., 1996. Brain damage caused by prenatal alcohol exposure. Science and Medicine, 4, 42-50.

ROTTA, L.N.; SCHINIDT, A.P.; MELLO e SOUZA, T.; NOGUEIRA, C.W.; SOUZA, K.B.; IZQUIERDO, I.A.; PERRY, M.L.S.; SOUZA, D.O., 2003. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochem. Res.**, v.28, p.1181-1186.

SANTOS, R. S., 2000. Nutrição, hipertireoidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SANTOS-MONTEIRO, J., 2002. Nutrição, Privação Sensorial Específica e Plasticidade Cerebral. Tese (Doutorado) – Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SANTOS-MONTEIRO, J., 2002 (a). Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. *Rev. bras. Saúde Matern. Infant.*, 2(1), 15-22.

SCOTT, H.C.; PAUL, W. K.; RUDEEN, P. K., 1992. Effects of in utero ethanol exposure on the development of LHRH neurons in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, v.66, 119-125.

SILVA, B. P. F.; MELO-JÚNIOR, M. R.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S.; PATUS, V. J. R. M.; CAVALCANTI, C. B. de L.; PONTES-FILHO, N. T., 2006. Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. *Rev. Paraense de Medicina*, v. 20 (1), 7.

SIREVAAG, A.M.; BLACK, J. E.; SHAFRON, D.; GREENOUGH, W. T., 1998. Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats. *Dev Brain Res*, 43, 299-304.

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

SYNDER, S. H., 1992. Nitric Oxide and neurons. *Current opinion in Neurobiology*, 2, 323-327.

TEODÓSIO, N. R.; LAGO, E. S.; ROMANI, S. A. M.; GUEDES, R. C. A., 1990. The regional basic diet (RBD) from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 4, 533-547.

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

WINICK, M.; NOBLE, A., 1996. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J.Nutr.*, v.89, 300-306.

YAN, X. X.; GAREY, L. J.; JEN, L. S. Development of NADPH-diaphorase activity in rat neocortex. *Developmental Brain Res*. 79:29-38, 1994.

Graphics

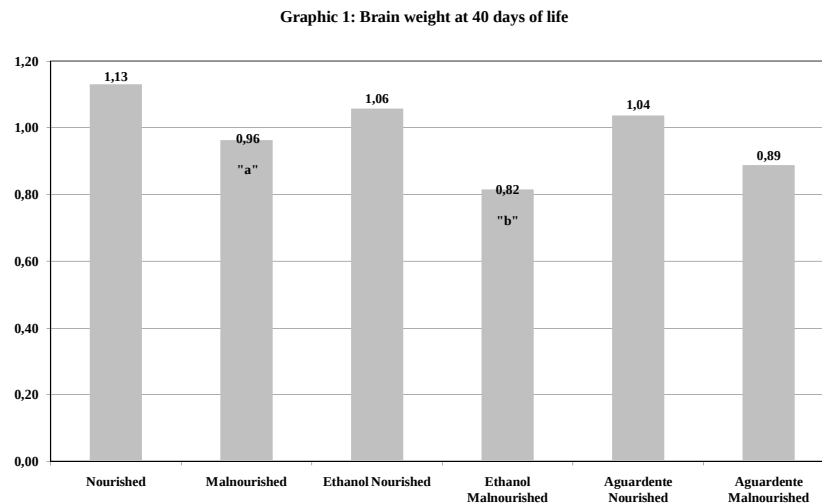


Fig.1 - rats brain weight (40 days old), bred and fed by mothers nourished (N) or malnourished (M) treated by gavage with 3.8 ml / day of water, brandy (Brandy Nourished-BN and Brandy Malnourished -BM) or ethanol (3g/kg - Ethanol Nourished and Malnourished NE-ME). The groups marked with the letter "a" statistically different ($p < 0.05$) in group Nourished and groups marked with the letter "b" group had statistically different (one-way ANOVA + test + Spjotvoll Stoline).

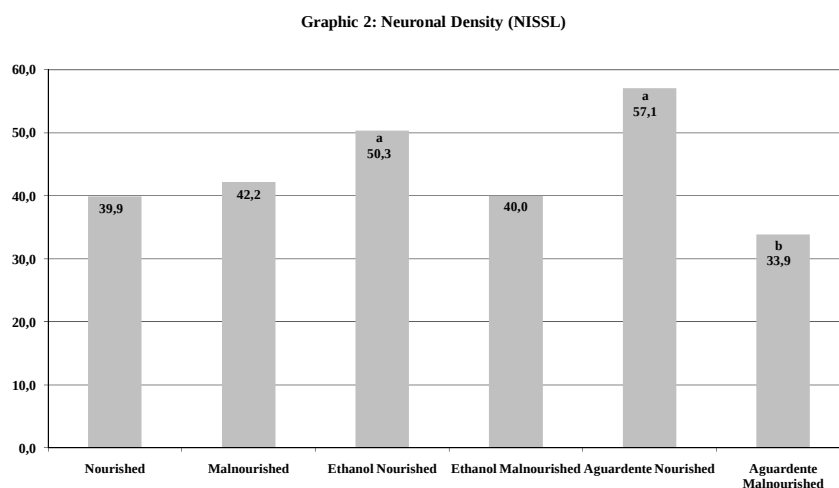


Fig.2 - Density neuronal serial sections of the visual cortex of Wistar rats 40 days old, bred and nurtured by mothers breastfed (Labina) or malnourished (multicarencial diet) were treated by gavage with 3.8 ml / day water (group - N and M), Brandy (groups - B- MB) or ethanol

(3g/kg - Groups E and ME). The data presented in the figure represent the average of the groups. The groups marked with the letter "a" statistically different ($p < 0.05$) in Nourished group and groups marked with the letter "b" differ statistically from the malnourished group (ANOVA + Tukey test)

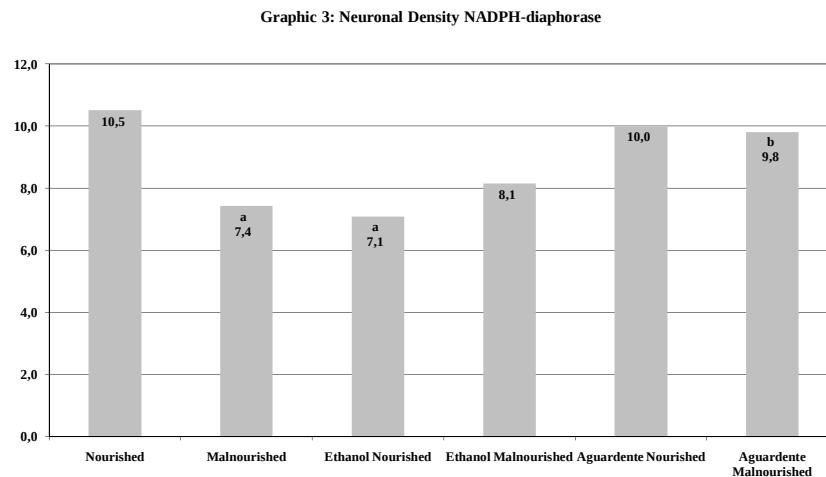


Figure 3 - Density of NADPH-d neurons in the visual cortex of Wistar rats 40 days old, bred and nurtured by mothers breastfed (Labina) or malnourished (multicarencial diet) were treated by gavage with 3.8 ml / day water (group - N and M), Brandy (groups - B - MB) or ethanol (3g/kg-groups E and ME). The data presented in the figure represent the average of the groups. The groups marked with the letter "a" statistically different ($p < 0.05$) in Nourished group and groups marked with the letter "b" differ statistically from the malnourished group (Kruskal Wallis + Mann - Wihtney).

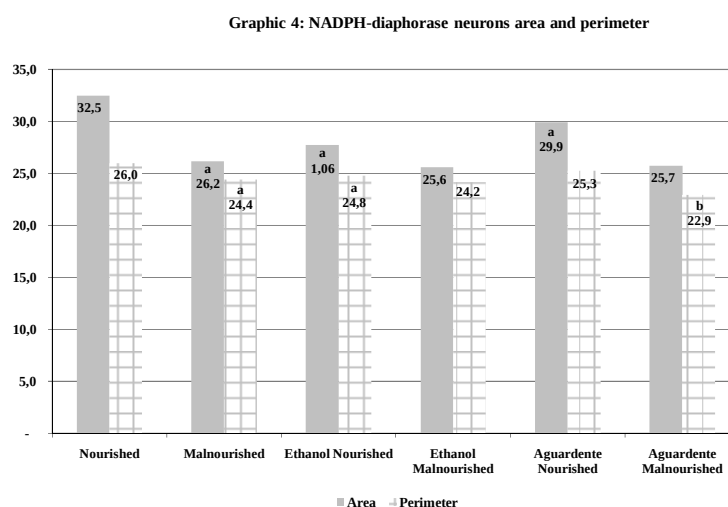


Fig.4 - Area (gray columns) and perimeter (checkered columns) of NADPH-d neurons in the visual cortex of Wistar males rats 40 days old, bred and nurtured by mothers breastfed

(Labina) or malnourished (multicarencial diet) treated by gavage with 3.8 ml / day of water (group - N and M), Brandy (groups - B - MB) or ethanol (3g/kg-group E - ME). The data presented in the figure represent the average of the groups. The groups marked with the letter "a" statistically different ($p < 0.05$) in Nourished group and groups marked with the letter "b" differ statistically from the malnourished group. (Kruskal Wallis + Mann - Wihtney).

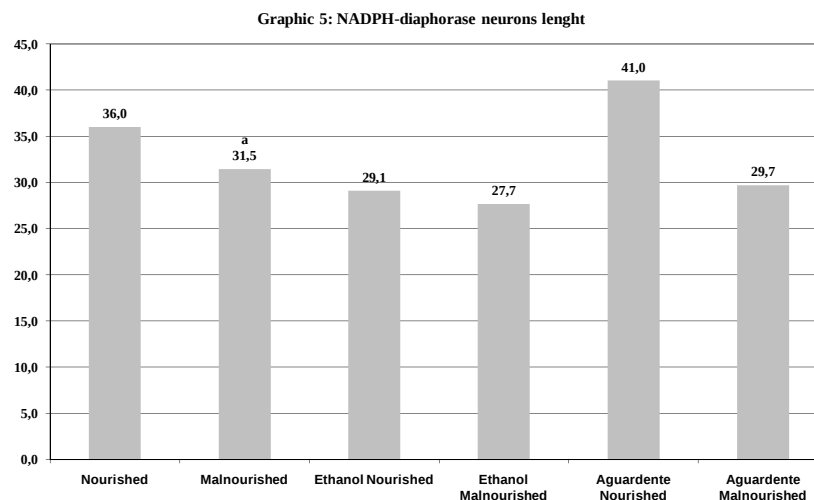


Fig.5 - Extension of the prolong of NADPH-d neurons in the visual cortex of Wistar males rats 40 days old, bred and nurtured by mothers breastfed (Labina) or malnourished (multicarencial diet) were treated by gavage with 3.8 ml / day of water (group - N - M), Brandy (groups - B - MB) or ethanol (3g/kg - Groups E and ME). The data presented in the figure represent the average of the groups. The groups marked with the letter "a" statistically different ($p < 0.05$) in Nourished group (ANOVA + Tukey).

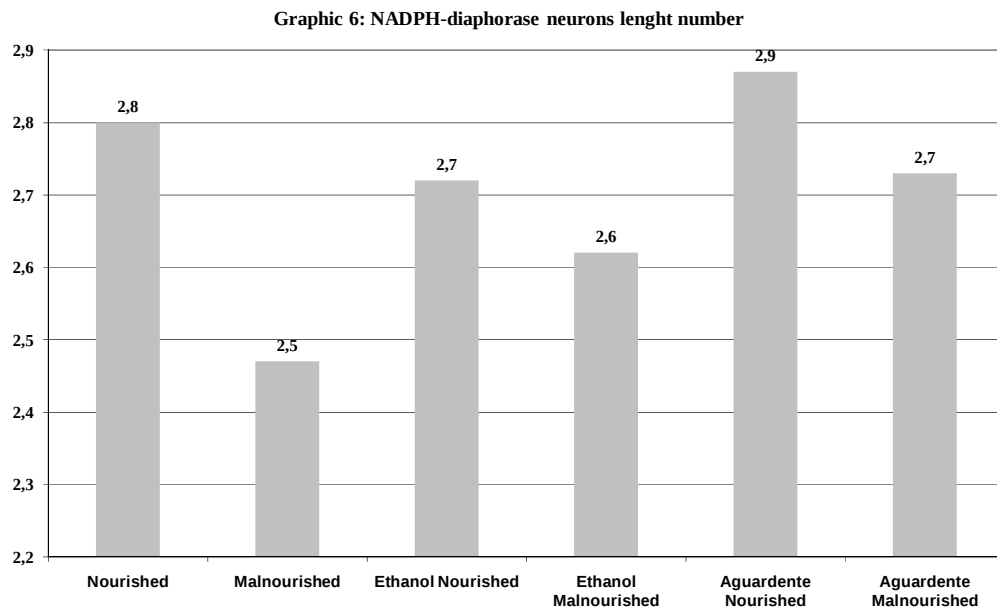


Fig.6-Number of primary extensions of NADPH-d + neurons in the visual cortex of Wistar rats 40 days old, bred and nurtured by mothers breastfed (Labina) or malnourished (multicarencial diet) were treated by gavage with 3.8 ml / day of water (group - N and D), Brandy (groups - A - AD) or ethanol (3g/kg - Groups E - ED). The data presented in the Graphic represent the average of the groups. The groups marked with the letter "a" statistically different ($p < 0.05$) in group Nourished (Kruskal Wallis + Mann - Wihtney).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O álcool e a desnutrição interferem, de forma isolada ou em associação, no desenvolvimento perinatal de ratos jovens modificando o padrão morfológico do córtex cerebral em ratos jovens aos 40 dias de vida.

1. Ocorre modificação do padrão histomorfológico do córtex cerebral em ratos wistar aos 40 dias de vida, observando-se que:
 - a) A desnutrição diminuiu a densidade, a área, o perímetro, a extensão e número de prolongamentos dos neurônios NADPH-d, porém não interferiu na densidade neuronal;
 - b) O tratamento com álcool causa aumento da densidade neuroglial, e em relação aos neurônios NADPH-d diminui a densidade, área e perímetro;
 - c) A interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com etanol induz redução da densidade de neurônios NADPH-d e da densidade neuronal;
 - d) A aguardente associada à desnutrição diminui a densidade neuronal (coloração Nissl), bem como o perímetro dos neurônios NADPH-d.

REFERÊNCIAS

ABEL E.L.; HANNIGAN J.H. Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: provocative and permissive influences. **Neurotoxicol Teratol**, v.17, p.445-462, 1995.

ABEL, E. L.; SOKOL, R. J. Fetal alcohol syndrome is now a leading cause of mental retardation. **Lancet.**, v. 2, p.1222, 1986.

ABRAHAM, M. H.; LIEB, W.R.; FRANKS, N.P. Role of hydrogen bonding in general anesthesia. **J. Pharmacol. Sci.**, v.80, p.719-724, 1991.

ACHORD, J. L. Nutrition, alcohol and liver. **Amer. J. Gastroenterol.**, v.83, p.224-248,1998.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric Oxide Synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v.357, p.593-615, 2001.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J Comp Neurol.** , v.137, p. 433-457,1969.

ARAÚJO-FILHO, J. S. A.; JÚNIOR, M. R. M.; VEIGA, R. K. A.; MACHADO, M. C. F. P.; PATU, V. J. R. M.; PONTES-FILHO, N. T. de; Análise histomorfométrica do coração de ratos expostos indiretamente ao etanol e à desnutrição crônica durante o período perinatal. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 6, n. 1, p. 17-25, 2007.

ARAÚJO J. A. **Estudo histomorfométrico do córtex visual de ratos expostos ao etanol e à aguardente**. 2005. Monografia (curso de Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

ARNSTEN, A.F.T.; CAI, J.X.; MURPHY, B.L.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. Dopamine 1 receptor mechanism in the cognitive performance of young adult and aged monkeys. **Psychopharmacology**, n.116, p. 143-151, 1994.

AVERSI-FERREIRA, T.A., MORAIS, J.O.R., FERREIRA, N.R., PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. **Braz J Morphol Sci.** v.21, p.97-101, 2004.

AVERSI-FERREIRA, T.A., CORRÊA, N.C.R., MORAIS, J.O.R., PENHA-SILVA, N. Postnatal effects of ethanol on neocortical neurogenesis in Wistar rats. **Neurociências.** v.1, p.304-310, 2005.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; PENHA-SILVA, N. Effects of ethanol on the neuronal migration in the brain neocortex formation. **Biosci J.** v.21, p. 151-157, 2005.

AVERSI-FERREIRA, T.A, RODRIGUES H.G, NERES A.C, FONSECA, L.C, PENHA-SILVA, N. Estudo imunohistoquímico do bulbo olfatório de ratos Wistar submetidos à exposição pré-natal aguda com etanol. **Biosci J.** v.22, p. 99-105, 2006.

AVERSI-FERREIRA, T. A.; NASCIMENTO, G. N. L. de; The effect of acute and chronic exposure to ethanol on the developing encephalon: a review. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, 8(3), p.241-249, 2008.

BARAONA, E.; LIEBER, C. S., Effects of ethanol on lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 20, p. 289-315, 1979.

BARRY, J. A.; GAWRISH, K. Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipids bilayers. **Biochemistry**, v.33, p.8082-8088, 1994.

BAYER SA, YACKEL JW, PURI PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. **Science.** v.216, p.890-892, 1982.

BERMAN, R. F.; HANNIGAN, J. H.; SPERRY, M. A.; ZAJAC, C. S. Prenatal alcohol exposure and effects of environmental enrichment on hippocampal dendritic spine density. **Alcohol** 13, pp. 209-216, 1996.

BORBA, J.M.C.; ARAÚJO, M.S.; PIKANÇO-DINIZ, C.W.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; GUEDES, R.C.A. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 193-201, 2000.

BRASIL. Decreto nº 4.851, 2 de outubro de 2003, artigo 92- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <http://www.receita.fazenda.gov.br/Legislacao/Decretos/2003/dec4851.htm> >. Acesso em: 07 dez. 2009.

BRODY, T. Alcohol, In: Nutritional biochemistry. **Academic Press** (London), 9 ed. p. 201-220, 1998.

BROOKS P. J.; THERUVATHU, J.A. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol**, v.35, p.187-193, 2005.

BURGOS, M. G. P. A. **Bebidas alcoólicas durante a lactação e seus efeitos na nutrição e metabolismo: estudo em ratos**. 2003. Tese (Doutorado – Departamento de Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BURGOS, M. G. P. A.; BION, F. M.; CAMPOS, F. A. C. S.; WANDERLEY, L. G. Efeitos de bebidas alcoólicas no metabolismo e nutrição de ratos lactentes recém-nascidos. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.** Recife, 49(1), p.50-55, 2004.

CABALLERO B. Global patterns of child health: the role of nutrition. **Ann Nutr Metab.**, v.46, p.3-7, 2002.

CALHOUN, F, WARREN, K. Fetal alcohol syndrome: historical perspectives. **Neurosci Biobehav Rev.** v.32, p.168-171, 2007.

CARDOSO-SILVA, D. C. A exposição crônica ao álcool e a desnutrição interferem no desenvolvimento do fígado durante o período perinatal? **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 22(3), p.01-27, 2007.

CAVINESS, Jr. V S. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H] thymidine autoradiography. **Brain Res.** v.256, p.293-302, 1982.

CHEN, W.J.A.; MAIER, S.E.; PARNELL, S.E.; WEST, J.R. Alcohol and the developing brain: Neuroanatomical studies. **Alcohol Res Health**, v.27, p.174-180, 2003.

CLARREN,S.K.; ASTLEY, S. J.; GUNDERSON, V. M. ; SPELLMAN, D. Cognitive and behavioral deficits in nonhuman primates associated with very early embryonic binge exposures to ethanol. **J. Pediatr.**, v.121, p.789-796, 1992.

CLIMENT, E.; PASCUAL, M.; RENAU PIQUEIRAS, J.; GUERRI, C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing serie cortex: role of brain-derived neurotrofic factor and its sign pathways. **Journal of Neuroscience on Research**, v.68, n.2, p. 213-225, 2002.

COBO, E. Effect of different doses of ethanol on the milk-ejecting reflex in lactating women. **American Journal of Obstetric and Gynecologic**, v.115, p.817-821, 1973.

COSTA, E. T.; SAVAGE, D. D.; VALENZUELA, C. F. A review of the effects of prenatal or early postnatal ethanol exposure on brain ligand-gated ion channels. **Alcohol: Clinical and Experimental Research**, v. 24, p. 706-715, 2000.

COSTA, L.G, GUIZZETTI, M. Inhibition of Muscarinic Receptor- Induced Proliferation of Astroglial Cells by Ethanol: Mechanisms and Implications for the Fetal Alcohol Syndrome. **Neurotoxicology**. v.102, p.1-7, 2002.

CRAMER, C.; DAVIDHIZAR, R.; FAS/FAE: impact on children. **J.Child Health Care**, v.3, p31-34,1999.

DANTAS, R. O. Alcoolismo em trabalhadores da zona urbana e rural. Uma experiência no Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitária Panamericana**, Washington, v. 94, p. 76-81, 1983.

DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. 10, p. 179-190, 1996.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V.L. Nitric oxide synthase: Role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. **Annu. Rev. Med.** 47, p. 219-227, 1996.

DIAMOND, I.; GORDON, A. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Rev.**, n. 77, p.1-20, 1997.

DICKINSON, R.; FRANKS, N.P.; LIEB, WR. Thermodynamics of anesthetic/protein interaction. Temperature studies on firefly luciferase. **Biophys. J.**, n.64, p.1254-1271, 1993.

DILDY, J.E.; LESLIE, S.W. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. **Brain Res.** 499, p. 383-387, 1989.

DLUGOS, S.A, PENTNEY, R.J. Quantitative immunocytochemistry on glia in the cerebellar cortex of old ethanol-fed rats. **Alcohol.**,v.23,p.63-69,2001.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVIDSON, A.N.;DOBBING,J. (ed.) **Applied Neurochemistry**. Oxford: Blackwell, p.287-316, 1968.

DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Earl Human Dev.**, v.3, p.79-83, 1979.

EDELMAN, G.M, JONES FS. Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. **Brain Res.** v.26, p.337-352, 1998.

EVARD, G. S.; VEGA, D. M.; RAMOS, J. A.; TAGLIA FERRO, P.; BRUSCO, A. Altered neuron-glia interactions in a low, chronic prenatal ethanol exposure. **Developmental Brain Research**, v.147,119-133,2003.

FADA, F.; ROSSETTI, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v.56, p.385-431, 1998.

FERREIRA, T.A. A.;FERREIRA, N. R.; MORAIS, J. O. R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in wistar rats. **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 21(2), p.99-103, 2004.

FIORENTIN, C.; VARGAS, D.; O uso de álcool em gestantes e o seus conhecimentos sobre os efeitos do álcool no feto. **Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog.**, v.2, n.2, 2006.

FISHER, J.O.; MIYCHELL, D.C.; SMICKLAS-WRIGHT, H.; BIRCH, L.L. Maternal milk consumption predicts the tradeoff between milk and soft drinks in young girls 'diets. **The Journal of Nutrition**, v.131, p. 246-250, 2001.

FORSANDER, O.A. Dietary influences on alcohol intake: a review. **Journal on Study of Alcohol**, v.59, p.26-31, 1998.

FREITAS, I.; GRIFFINI, P.; BERTONE, V.; BERTONE, R.; FENOGLIO, C.; MILLIERY, R.; VAIRETTI, M. In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 591-602, 2002.

FUJITA S, SHIMADA M, NAKAMURA T. H3 Thimidine autoradiographics studies on the cell proliferation and differentiation in the external and internal granular layers of the mouse cerebellum. **J Com Neurol.**, v.128, p.191-208,1966.

GABBOTT, P. L. A.; BACON, S. J. Localization of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivit in astroglia in normal adult rat brain. **Brain Research**, v.714, p. 135-144, 1996.

GALDUROZ, J. C. F.; **1º Levantamento domiciliar nacional sobre o uso de drogas psicotrópicas**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2000.

GALDUROZ, J. C. F.; Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. **Rev Bras Psiquiatr**, v.26 (Supl I), 3-6, 2004.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends in neurosciences**, v.14, p.60-67,1991.

GELOT, A.; ESPERANDIEU, O.; POMPIDOU, A. Histogenesis of the corpus callosum. **Neurochirurgie.**, v.44,p61-73,1998.

GIL-MARTÍN, E.; COLADO, I.; FERNÁNDES-LÓPES, A.; FERNÁNDES-BRIERA, A.; CALVO, P. Effects of an acute dose of ethanol on dopaminergic and serotonergic system from rat cerebral cortex and striatum. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.113, n.3, p.399-402, 1996.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; DE LA CRUZ, A.P.; MANTOLAN-SARMIENTO, B. Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: Effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.44, p. 1399-1413, 1996.

GONÇALVES, L. A.; **Efeito da restrição alimentar e do envelhecimento sobre o sistema colinérgico cortical de ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, 2001.

GRANATO, A.; SANTARELLI, M.; SBRICCOLI, A.; MINCIACCHI, D. Multifaceted alterations of the thalamo-cortico-thalamic loop in adult rats prenatally exposed to ethanol. **Anat. Embryol.**, v.191, p.11-23, 1995.

GRANATO, A.; PELT, J. V. Effects of early ethanol exposure on dendrite growth of cortical pyramidal neurons: inferences from a computational model. **Developmental Brain Research**, v.142, p. 223-227, 2003.

GUEDES, G. de M. R. **Efeitos da desnutrição protéica crônica sobre o córtex cerebral e evolução ponderal de ratos adultos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Departamento de pós-graduação em Patologia - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

GUEDES, R.C.A. **Estudo eletrofisiológico do cérebro em diferentes estados nutricionais associados ao envelhecimento, à estimulação ambiental, ao hipotireoidismo e ao consumo de etanol através do modelo da depressão alastrante cortical.** Tese (concurso de Professor Titular – Departamento de Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1992.

GUEDES, R.C.A.; FRADE, S. F. Effect of ethanol on cortical speeding depression, **Brazilian Med. Biol. Res.**, n. 26, p.1241-1244, 1993.

GREEN JT. The effects of ethanol on the developing cerebellum and eyeblink classical conditioning. **Cerebellum**, v.3, p.178-187,2004.

GRESSENS P. Mechanisms and disturbances of neuronal migration. **Pediatr Rev.**, v.48, p.725-730, 2000.

GUERRI, C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.22, p.304-312,1998.

HALSTED, C. H. Ethanol feeding of micropigs increased methionine metabolism and proliferation. **Hepatology**, v.23, p.497-505,1996.

HANALY, K. A; KRUMENACKER, J. S.; MURAD, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Med.Sci.Monit.**, 7,p.801-819,2001.

HARPER, C. The neurotoxicity of alcohol. **Hum Exp Toxicol**.v.26,p.251-257,2007.

HEATON, M. B., SWANSON, D. J., PAIVA, M., WALKER, D.W. Influence of prenatal ethanol exposure on cholinergic development in the rat striatum. **J Comp Neurol.**, v.364, p.113-120, 1996.

HUANG,Z.;HUANG,P.L.;DANAHIAN,N.;DALKARA,T.;FISHMAN,M.C.;MOSKOWITZ, M.A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science**. 265:1883-1885,1994.

INKONOMIDOU,C.; BITTIGAU,P.; KOCH,C.; GENZ,K.; HOERSTER,F.; FELDERHOFF-MUESER,U.;TENKOVA,T.;DIKRANIAN,K.;OLNEY,J.W. Neurotransmitters and apoptosis in developing brain. **Biochemical Pharmacology**, 62,p.401-405,2001.

JERÔNIMO, M. S.; PONTES-FILHO, N. T.; MELO-JÚNIOR, M. R. de; Efeitos da exposição pré-natal e pós-natal ao etanol no córtex cerebral de ratos: um estudo do neurópilo. **J Brás Patol Med Lab**, v.44,n.1, p.59-64, 2008.

JONES, K. K.; SMITH, D. W.; ULLELAND, C. N.; STREISSGUTH, A. P.; Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet**, v.1, p. 1267-1271, 1973.

KLINTSOVA, A.Y.; COWELL, R.M.; SWAIN, R.A.; NAPPER, R.M.; GOODLETT, C.R.; GREENOUGH, W. T. Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats. I. Behavioral results. **Brain Research**, v. 800, p. 48-61, 1998.

KORSTEN, M.A. Alcoholism and pancreatitis: does nutrition play a role? **Alcohol Health e Research World** 13(3), p. 323, 1989.

LANCASTER, F.E.; PHILLIPS, S.M.; PATSALOS, P.N.; WIGGINS, R.C. Brain myelination in the offspring of ethanol-treated rats: in utero versus lactation exposure by crossfostering offspring of control, pair fed and ethanol treated dams. **Brain Research**, v. 309, p. 209-216, 1984.

LEO, M. A. Metabolism of retinol and retinol acid by human liver cytochrome II C8. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 269, p. 305-312, 1989.

LIEBER, C.S.; JONES, D.P.; DeCARLI, L.M.; Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver despite adequate diets. **J. Clin. Invest.**, n.44, p. 1009-1021, 1965.

LIEBER, C. S. Alcohol and liver. **Gastroenterology**, v.106, p.1085-1105, 1994.

LIEBER, C. S. Medical disorders of alcoholism. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 333, p. 1058-1065, 1995.

LIESI, P. Ethanol-exposed central neurons fail to migrate and undergo apoptosis. **J. Neurosci Res.**, v.48, p.439-448, 1997.

LOIS, C.: ALVAREZ-BUYLLA, A. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**. V.264, p.1145-1148, 1994.

LUO, J.; MILLER, M.W. Basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-mediated cell proliferation in B104 neuroblastoma cells: effects of ethanol on cell cycle kinetics. **Brain Res.**, v.770, p. 139-150, 1997.

LUO, J.; MILLER, M.W. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. **Brain Res.**, n.27, p. 157-167, 1998.

MAEDA N, NODA M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTBeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth associated molecule (HB-Gama) in neuronal migration. **J Cell Biol.**, v.142, p.203-216,1998.

MARCUSSEN, B.L.; GOODLETT, C.R.; MAHONEY, J.C.; WEST, J.R. Alcohol induced Purkinje cell loss during differentiation but not during neurogenesis. **Alcohol**, n.11, p. 147-156, 1994.

MARIN –PADILLA M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. **J Comp Neurol.**, v.321, p.223-240, 1992.

MATTSON, M.; HAUSER, H. Spatial and temporal interaction of neurotransmitter signals in the development of neural circuitry. **Neurochem. Int.** v.19, p.17-24, 1991.

MEDEIROS, J. M. B.; FILHO, J. E. C.; SOUZA, S. L. D.; SILVA, S. R.F.; MENDES da SILVA,C.;DEIRÓ,T.C.B.J.;MONTEIRO,J.M.;GUEDES,R.C.A.;CASTRO,C.M.M.B.;MAN HÃES de CASTRO,R. Early malnourished rats are no affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutr. Neurosci.**, v.5, p.211-214,2002.

McGUIRE, M. K.; LITTETON, A.W.;SCHULZE,K.J.;RASMUSSEN,K.M. Pre and post weaning food restrictions to determine reproductive success and Milk volume in rats. **J. Nutr.** v.125, 2400-2406, 1995.

MELO-JÚNIOR, M. R.; MACHADO, M. C. F. P.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S.; PATU, V. J. R. M.; BELTRÃO, E. I. C.; PONTES-FILHO, N. T. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. **Rev. Paraense de Medicina**, v.20(4), p.7, 2006.

MENELLA, J. A. Infant's suckling responses to the flavor of alcohol in mother's milk. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.21, p.581-585, 1997.

MILLER, M.W. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. **Alcohol Clin Exper. Res.**, n.17, p. 304-314, 1993.

MILLER, M. W.; DOW-EDWARDS. Structural and metabolic alterations in rat cerebral cortex induced by prenatal exposure to ethanol. **Brain Res.**, v.474, p.316-326,1988.

MILLER, M.W.; POTEMPA, G. Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: effects of prenatal exposure to alcohol. **The Journal of Comparative Neurology**, n.293, p.92-102, 1990.

MOONEY, S.M.M.; NAPPER, R. M. A.; WEST, J. R. Long-term effect of postnatal alcohol exposure on the number of cells in the neocortex of the rat: A stereological study. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, n.20, p.615-623, 1996.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAS-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n.17, p.91-128, 1993.

MORGANE, O.J.; MOKLER,D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal formation. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v. 26, 471-483, 2002.

NEGRETE, J. C. El alcohol y las drogas como problemas de salud en America Latina. **Boletin de La Oficina Sanitaria Panamericana**,v.81,p.158-175,1976.

NELSON, R.J.; KRIEGSFELD, L.J.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v.18, p. 463-491, 1997.

NEVES, J. D.; FACCIN, G. L.; TAVARES-DO-CARMO, M. das G. Efeito da ingestão de álcool durante a lactação sobre a produção e composição do LM e sobre o crescimento da prole: estudo em ratas. **Revista de Nutrição da Puccamp**, v.8, p.47-64,1995.

NIXON, K.; CREWS, F. T. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adults rats hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, n.83, p.1087-1093, 2002.

O'BRIEN, J. M.; ALEXANDER, E. D. The invisible enemy. **Annual Scholar**, v.1, p.31-46, 1980.

OGURA, T.; NAKAYAMA, K.; FUJISAWA, H.; ESUMI, H. Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. **Neuroscience Letters**, v.204, p. 89-92, 1996.

OPS/ILSI. **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 6.ed. Washington, 1991.

OTHMAN, T.; LEGARE, D.; SADRI, P.; WAYNE, W.; PARKINSON, F.E. A preliminary investigation of the effects of maternal ethanol intake during gestation and lactation on brain adenosine A1 receptor expression in rat offspring. **Neurotoxicology and Teratol**, v. 24, n. 2, p. 275-279, 2002.

ÖZER, E.; SARIOGLU, S.; GÜRE, A. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. **Clin. Neuropath.** v.19, n.1, p.21-25, 2000.

PAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central Nervous System. **Annals of Medicine – University of Helsinki**. 27:p. 369-377, 1995.

PAIVA, A. M. A. **Efeitos do tratamento com etanol durante a gestação e o aleitamento sobre a depressão alastrante cortical em ratos adultos jovens**. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Departamento de Nutrição - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

PALENCIA, G.; TEIXEIRA, F.; ORTIZ, A.; PEREZ, R.; RIOS, C.; SOTELO, J. Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: A study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of large human groups. **J. Stud. Alcohol**, v.55, p. 113 - 120, 1994.

PALMER, A.A., PRINTZ, D.J., BUTLER, P.D., DULAWA, S.C., PRINTZ, M.P. Prenatal protein deprivation in rats induces changes in prepulse inhibition and NMDA receptor binding. **Brain Res.**, v.996, p.193-291, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4ed. Califórnia USA, **Academic Press**, 1998.

PECHANSKY, F.; SZOBOT, C. M.; SCIVOLETTO, S., 2004. Uso do álcool entre adolescentes: conceitos, características epidemiológicas e fatores etiopatogênicos. *Rev Bras Psiquiatr*, 26 (Supl I), 14-17.

PEREIRA-SILVA, M. S.; OLIVEIRA, L. M. Desnutrição e níveis de aminas biogênicas no sistema nervoso central. **Nutrire.**, v.29,2007.

PESSOA, D.N.P.; LAGO, E. S.; TEODÓSIO, N. R.; BION, F. M. Dietary proteins on reproductive performance in three consecutive generations of rats. **Arch Latinoamericanos de Nutr.**,v.50,p.55-61,2000.

PESSOA, D. C. N. P.; LAGO, E. S.; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M.; VARELA, R. M.; TEODÓSIO, N. R. Influência do teor e qualidade de proteína da dieta sobre o crescimento corporal e desenvolvimento de órgãos, em três gerações sucessivas de ratos. **Nutrire.**,v.30, p.31-52,2005.

PETERS, A.; KARA, DA.; HARRIMAN, K.M. The neuronal composition of area 17 of visual cortex. III. Numerical considerations. **J. Comp. Neurol.**, n.238, p.263-274, 1985.

PHILLIPS, D.E.; KRUEGER, S. K.; WALL, K.A.; SMOYER-DEARING, L. H.; SIKORA, A.K. The development of the blood-brain barrier in alcohol-exposed rats. **Alcohol**, v.14, p.333-343, 1997.

PICANÇO-DINIZ, C.W.; ARAÚJO, M.C.; BORBA, J.C.M.; GUEDES, R.C.A. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. **Nutritional Neuroscience** 1, p.35-48, 1998.

POLLARD I. Neuropharmacology of drugs and alcohol in mother and fetus. **Semin Fetal Neonatal Med.**, v.12,p.106-113,2007.

PONTES - FILHO, N. T. - **Morfometria e histoquímica do córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao álcool e a desnutrição.** 2003. Tese (Doutorado em Nutrição)– Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife,2003.

PRAZERES, F. G. PESSOA, D. C. N. P., BION, F. M., ARNAULD, T. M. S. Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.**, v.18, p.7-16, 2004.

PRENTICE, A.M. Alcohol and obesity. **International Journal of Obesity**, v.19, p.44-50,1995.

RANADOS ROJAS, L.; LARRIVA-SAHU, J.; CINTRA, L.; GUTIÉRREZ OSPINA, G.; RONDÁN, A.;DÍAZ-CINTRA, S. Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescence asymmetrical synapses in adult rats. **Brain Res.**, v.933, p.164-171,2002.

RANADE, S.C.;ROSE,A.;RAO,M.;GALLEGO,J.;GRESSENS,P.;MANI,S. Different types of nutritional deficiencies affect different domains spatial memory function checked in a radial arm maze. **Neuroscience**, v.152, p.859-866, 2008.

RAKIC P. Principles of neural cell migration. **Experientia.**, v.46,p.882-891,1990

REDECKER, C.;HAGEMANN, G.; WITE, O.W.; MARRET, S.; EVRARD, P.; GRESSENS, P. Long term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. **Brain Res.**,v.109, p.109-113,1999.

REN, J.; LOREN, E.; NATAVIO, M.; REN, B.H.; HANNIGAN, J. H.; BROWN, R. A. Influence of prenatal alcohol exposure on myocardial contractile function in adult rat hearts: role of intracellular calcium and apoptosis. **Alcohol and Alcoholism**, v.37, n. 1, p. 30-37, 2002.

REZENDE, G.H.S. **Neuroplasticidade induzida pelo status epilepticus em ratos normonutridos e desnutridos**. Dissertação de Mestrado – Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte,2006.

ROCHA-DE-MELO, A.P. **Modificação do estado nutricional no rato recém-nascido, por manipulação da ninhada: Estudo morfofuncional do sistema nervoso**. Tese (Doutorado em Nutrição) - Departamento de Nutrição- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

ROSENBERG, A. Brain damage caused by prenatal alcohol exposure. **Science and Medicine**, n.4, p.42-50, 1996.

ROTTA,L.N.;SCHINIDT,A.P.;MELLO e SOUZA,T.; NOGUEIRA,C.W.; SOUZA,K.B.; IZQUIERDO,I.A.;PERRY,M.L.S.;SOUZA,D.O. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochem. Res.**, v.28, p.1181-1186, 2003.

RUDIEN, P.K., Melatonin effects on ethanol-induced growth retardation and death in chick embryos. **RSA/ISBRA Abstracts, Alcoholism**, p. 71,1995.

RYABININ, A.E; COLE, M.; BLOOM, F.E.; WILSON, M.C. Exposure of neonatal rats to alcohol by vapor inhalation demonstrates specificity of microcephaly and Purkinje cell loss but not astrogliosis. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 19, p.784-791,1995.

SANCHIS, R.; SANCHO-TELLO, M.; GUERRI, C. The role of liquid diet formulation in the postnatal ethanol exposure of rats via mother's milk. **Journal of Nutrition, Bethesda**, v. 119, p. 82-91, 1989.

SANTOS, R. S. **Nutrição, hipertireoidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados.** Dissertação (Mestrado)- Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

SANTOS-MONTEIRO, J. **Nutrição, Privação Sensorial Específica e Plasticidade Cerebral.** Tese (Doutorado) – Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife,2002.

SCHOPPET, M.; MAISH, B. Alcohol and heart. **Herz, Munchen**, v. 26, n. 5, p. 345-352, 2001.

SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. Nitric oxide synaptic function. *Annu. Rev. Neurosc.* 17:153-183, 1994.

SCOTT, H.C.; PAUL, W. K.; RUDEEN, P. K. Effects of in utero ethanol exposure on the developmental of LHRH neurons in the mouse. **Dev. Brain Res.**, v.66,p.119-125,1992.

SHIBLEY, I.A; MCINTYRE, T.A; PENNINGTON, S.N. Experimental models used to measure direct and indirect ethanol teratogenicity. **Alcohol and Alcoholism**, v.34, p. 125-40, 1999.

SIDMAN, R.L; RAKIC, P. Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. **Brain Res.**, v.62, p.1-35,1973.

SILVA, B. P. F.; MELO-JÚNIOR, M. R.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S.; PATUS, V. J. R. M.; CAVALCANTI, C. B. de L.; PONTES-FILHO, N. T. Efeitos da exposição perinatal à

aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. **Rev. Paraense de Medicina**, v. 20 (1), p. 7, 2006.

SILVA, V. A., Ambiente e desenvolvimento: efeitos do álcool etílico e da desnutrição. **Mundo & Vida**, v. 2(1), p.1-27, 2000.

SILVA, V. A.; SILVA, J. B.; GISMOND, R. A. O. C.; RABELO, G. P. Ethanol improves lactation outcome in malnourished rats. **Nutricional Neuroscience**, v.3, p.277-82, 2000.

SOUZA, A. G.; RODRIGUES, H. G.; SERPA-VIEIRA, C. M.; MATEUS, M. V.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo imunohistoquímico do cerebelo de ratos Wistar submetidos à exposição aguda ao etanol no 12º dia de vida intrauterina. **Rev Electr Fac Farm.**, v.3, p.6-14,2006.

SPADONI, A.D.; MCGEE, C.L.; FRYER, S.L.; RILEY, E.P. Neuroimaging and alcohol spectrum disorders. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.31, p.239-245,2007.

STRATTON, K.; HOWE, C.; BATTAGLIA, F. Fetal alcohol syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention and treatment. **Washington, DC: National Academy Press**, 1996.

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

SUPÉR, H.; SORIANO, E.; UYLINGS, H.B. The functions of the pre late in development and evolution of the neocortex and hippocampus. **Brain Res.**, v.27, p.40-64,1998.

SWANSON, D.J; TONJES, L.; KING, M.A.; WALKER, D.W.; HEATON, M.B. Influence of chronic prenatal ethanol on cholinergic neurons of the septo hippocampal system. **J Comp Neurol.**, v.364, p. 104-112, 1996.

SYAPIN, P.J. Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain. **Alcohol** v.16, p. 159-165, 1998.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWISK, R.S.; CAVINESS, Jr. V.S. Interkinetic and migratory behavior of cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. **J Neurosci.**, v.16, p.5762-5776, 1996.

TATLI,M.; GUZEL, A.; KIZIL,G.; KAVAK,V.; YAVUZ,M.; KIZIL,M. Comparison of the effects on maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. **Brain Res.**, v.1156, p.21-30, 2007.

TAVARES, E.; GOMES-TUBIO, A.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Brown and white adipose tissue lipid composition in the three successive progenies of rat: effects of ethanol exposure. **Archives Tierernanhr**, v. 55, n. 1, p. 53-67, 2001.

TEODÓSIO, N. R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A.M.;GUEDES,R.C.A.,A regional basic diet (RBD) from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion.** v.4, p.533-547, 1990.

TEOH, S.K, MELLO, N.K, MENDELSON, J.H. Effects of drugs of abuse on reproductive function in women in pregnancy. In: WATSON R.R. Addictive behaviors woman. Arizona. Human Press, 1994. cap. 17, p.437-73.

THOMAS, JD.; BURCHETT, T. L.; DOMINGUEZ, H. D.; RILEY, E.P. Neonatal alcohol exposure producers mor severe motor coordination deficits in high alcohol sensitive rats compared to low alcohol sensitive rats. **Alcohol**, v.20, p. 93-99,2000.

THOMAS, JD.; GOODLETT, CR.; WEST, JR. Alcohol-induced Purkinje cell loss depends on developmental timing of alcohol zexposure and correlates with motor performance. **Developmental Brain Research**, 105, p. 159-166, 1998.

TONKISS, J.; GALLER,J.; MORGANE, P. J.;BRONZINO, J.D.; AUSTIN-LaFRANCE, R. J. Prenatal protein malnutrition and postnatal Brian function. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**,v.678,p.215-227,1993

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Centro Brasileiro de Informações sobre drogas psicotrópicas** (CEBRID). Obtido em 02-11-2002. Disponível em: www.unifesp.br/dpsicobio.

VALLEE, B. L. Alcohol in human history. In: JAPON,B.:JORNVAL, H.; RYDBERG, U.; TERENIUS, L. Toward a molecular basis of alcohol use and abuse. Basel: Birkhauser Verlag, p. 1-8, 1994.

VALLES S, SANCHO -TELLO M, MIÑANA R, CLIMENT E, RENAUI-PIQUERAS M J, GUERRI C. Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. **J Neurochem.**, v.67, p.2425-2433, 1996.

VALLANCE, P.; LEIPER, J. Blocking NO synthesis: How, Where and Why? **Nature Reviews**, 1, p.939-950, 2002.

VÉLEZ-DOMÍNGUEZ LC. Transtornos da migração neuronal. **Gac Med Mex.**, v.134, p.207-215, 1998.

VILELA, M. C. R.; MENDONÇA, J. E. F.; BITTENCOURT, H.; LAPA, R. M.; ALESSIO, M. L. M.; COSTA M. S. M.O.; GUEDES, R. C. A.; SILVA, V. L.; ANDRADE da COSTA, B.L.S. Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. **Brain Research Bulletin**, v.64, p.395-408, 2005

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 Puccamp**, Campinas, v.7, p.132-147, 1994.

VITOLO, M. R. **Nutrição da gestação à adolescência**. Rio de Janeiro, RJ: Reichmann e Affonso Editores, 2003.

VOLPI, E. Moderate and large doses of ethanol differentially affect hepatic protein metabolism in humans. **The journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, p. 198, p. 198-203, 1998.

WEST, J. R.; GOODLETT, C.R & BRANDT, J.P. New Approaches to Research on the Long-term Consequences of Prenatal Exposure to Alcohol. **Alcoholism: Clin. Exp. Res.** , v.14, p.684-689, 1990.

WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S. J. Malnutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sci.**, v.35, p.2085-2094,1984.

WILSNACK S.C.; KLASSEN A.D.; WILSNACK R.W. Drinking and reproductive dysfunction among women in a 1981 national surgery. **Alcoholism.**, v.8,p.451-458,1984.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and protective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine.** 25, p. 434-456, 1998.

YURITTAS, I.; DALE, B. E.; KLEM, W.R. FTIR evidence for alcohol binding and dehydration in phospholipid and ganglioside micelles. **Alcohol Clin. Exp.**,v.16.p.863-869,1992.

ZHU W.; VOLKOW N.D.; M. A.Y.; FOWLER J.S.; WANG G.K. Relationship between ethanol-induced changes in brain regional metabolism and its motor, behavioral and cognitive effects. **Alcohol Alcohol.**,v.39,p.53-58,2004.

ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro que autorizo a utilização de material biológico por mim obtido durante o desenvolvimento da pesquisa para defesa da minha Tese de Doutorado em Nutrição intitulada "MORFOMETRIA E HISTOQUÍMICA DO CÓRTEX DE RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO ÁLCOOL E A DESNUTRIÇÃO" – Recife 2003, pelo Setor de Patologia do LIKA.

Outrossim, informo que o referido material pode ser utilizado em outros projetos de pesquisa, devendo ser inserido em futuros trabalhos científicos o nome do autor.

Recife, 29/05/2008.


NICODEMUS TELES DE PONTES FILHO
PROF. TITULAR
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
UFPE
LIKA

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Recife, 28 de fevereiro de 2003

Ofício nº 119/2003

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Ao Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho
Departamento de Patologia da UFPE

Prezado Professor,

Após o recebimento de seu projeto de pesquisa intitulado “Morfometria e histoquímica do córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao etanol e à desnutrição” os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais adotados.

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 CEEAA-UFPE.

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, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

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

Atenciosamente,

Profª. Belmira Lara da S. Andrade da Costa
Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE

ANEXO C – COMPOSIÇÃO LABINA

Composição Básica: Milho, Farelo de trigo, Farelo de soja, Farinha de carne, Farelo de arroz cru, Carbonato de cálcio, Fosfato bicálcico, sal e Pre-Mix.

Enriquecimento por Kg de produto

Vitamina A	20.000 UI
Vitamina D3	6.000
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	6 mg
Vitamina B12	10 mg
Vitamina B2	28 mg
Pantotenato de cálcio	24 mg
Niacina	95 mg
Tiamina	4 mg
Colina	2.000 mg
Piridoxina	6 mg
Biotina	0,1 mg
Acido Fólico	0,5 mg
Manganês	50 mg
Iodo	2 mg
Ferro	65 mg
Zinco	35 mg
Cobre	26 mg
Antioxidante	100 mg

Níveis de Garantia (%)

Umidade (máxima)	13,0
Proteína (mínima)	23,0
Extrato etéreo (mínima)	2,5
Matéria fibrosa (máxima)	9,0
Matéria mineral (máxima)	8,0
Cálcio (máxima)	1,8
Fósforo	0,8

* Segundo Purina do Brasil

ANEXO D - COMPOSIÇÃO DBR

Composição em porcentagem da Dieta Básica Regional (DBR), Nordeste-Brasil

Ingredientes	Peso (g/100g)	Proteínas	Carboidratos	Gordura	Resíduos	Fibras	(Kcal%)*
Feijão mulatinho*	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Farinha de mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,8
Charque*	3,74	2,74	—	0,06	0,06	—	11,50
Gordura (contida na charque)	0,35	—	—	0,35	—	—	3,15
Batata doce*	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	41,43
Total	100,00	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	315,6

* Submetidos ao cozimento, secagem e granulação. ** Kcal proveniente de cada 100g da dieta.

ANEXO E – CERTIFICADO DE ANÁLISE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE CROMATOGRAFIA INSTRUMENTAL
Rua Torza Melia, s/n - Campus Universitário - Recife - PE - Fone (081) 271.87112 - FAX (081) 3271.0095 - E-mail: aschuler@mpd.ufpe.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Certificado Nº : 007-A/2002

Natureza da Análise: Produtos secundários em álcool/aguardente

RESULTADO (expresso em mg/L do produto) :

COMPONENTE	TEOR (mg/100 mL)	
	Alcool	Aguardente
Acetaldeído	n. d.	2,7
ciclo-Hexano	n. d.	n. d.
Acetona	n. d.	n. d.
Acetato de Etila	n. d.	1,3
Alcool Metílico	n. d.	1,6
Alcool <i>n</i> -Propílico	n. d.	15,5
Alcool <i>iso</i> -Butílico	n. d.	21,0
Alcool <i>n</i> -Butílico	n. d.	0,5
Alcool <i>iso</i> -Amílico	n. d.	71,6

n. d. = não detectado (teor < 0,1 mg/100 mL)

Recife, em 26 de julho de 2002


Prof. Alexandre Ricardo Pereira Schuler
Chefe do Laboratório de Cromatografia

ANEXO F- NORMAS DA REVISTA BRAIN RESEARCH

Brain Research Combined Subscription

Guide for Authors

An international multidisciplinary journal devoted to fundamental research in the brain sciences.

Now incorporating *Cognitive Brain Research*, *Developmental Brain Research*, *Molecular Brain Research* and *Brain Research Protocols*

SCOPE

Brain Research publishes papers reporting interdisciplinary investigations of nervous system structure, function and chemistry at all levels of resolution, from molecular to behavioral and social that are of general interest to the broad community of neuroscientists. Clinical investigations, Protocols and Minireviews will also be considered for publication if they provide significant insight into the structure or function of the nervous system, the pathophysiology of a disease, or its treatment. Computational and theoretical papers will also be considered.

Reviews and Minireviews will generally be by invitation, but suggestions are welcomed.

In the Journal's Table of Contents, published papers will be shown under one of the appropriate Section titles listed (in bold type) below - either in *Brain Research* or, for review articles, in *Brain Research Reviews*. The first section (*Systems Neuroscience*) is further subdivided into three segments.

SUBMISSION POLICY

Submission of a paper to *Brain Research* is understood to imply that it deals with original material not previously published, and that it is not being considered for publication elsewhere. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed Authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the article shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the written consent of the Editors and Publisher.

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has

preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

New nucleotide data must be submitted and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the three collaborating databanks is sufficient to ensure data entry in all (see details below).

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10,000 and above). Authors in Japan please note that, upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier, 4F Higashi-Azabu, 1 Chome Bldg, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; Tel. (03)-5561-5032; fax (03)-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com. The layout and style should adhere strictly to the instructions given under "Organisation of the Article". No revisions or updates will be incorporated after the article has been accepted and sent to the Publisher (unless approved by the Editors).

SUBMISSION PROCEDURE

Web submission is required - instructions are available for downloading on the website <http://ees.elsevier.com/bres>

Brain Research Editorial Office, Elsevier, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, USA; Fax: (1)-619-699.6855, Email: bres@elsevier.com

In the covering letter with their submission, Authors are required to state under which (sub)section heading their article, if accepted for publication, should appear (*see section titles above, under "Scope"*).

Where possible, Authors should also include a list of three or more potential reviewers for their manuscript, with contact information.

PREPARING ELECTRONIC MANUSCRIPTS

Keep text, tables and graphics (and any other items) as separate files - *do not import the figures or tables into the text file*. Name your files using the correct extension, e.g. text.doc, fig1a.eps, fig1.tif, Fig1. jpg, tbl1-6.xls.

Text files should be supplied in one of the following formats: Microsoft Word or WordPerfect, Windows or Macintosh formatted. Ensure that the letter "l" and the digit "1" (also letter "O" and digit "0") have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your wordprocessor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but indicated by a unique code (e.g.

alpha, @, #, etc. for the Greek letter alpha). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. When accepted articles are processed, most formatting codes will be removed or replaced so there is no need for you to use excessive layout styling. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references).

However, do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. for scientific nomenclature. When preparing tables, if you are using a table grid, please use only one grid for each separate table and not a grid for each row. If no grid is being used, use tabs to align columns, not spaces.

Graphic files: See the Elsevier website <http://authors.elsevier.com/artwork> for guidelines for preparing electronic artwork. *N.B. With Web submission, only the following formats are acceptable: TIFF, PDF and EPS. Each figure should be a separate file and not be embedded in the text.*

All graphic files must be submitted in sufficiently high resolution (300 dpi for grayscale or colour images and 600-1000 dpi for line art) to allow for printing.

Preparation of supplementary data. Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more.

Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Electronic submission of articles via the Web (<http://www.ees.elsevier.com/bres>)

Full instructions for uploading data and files etc. are given on the website when submitting a manuscript. It is the responsibility of the Authors to create the proper files as instructed above for the electronically submitted manuscript. The editorial office cannot make conversions beyond the supported file types. No hardcopy manuscripts or illustrations are to be sent to the Editors unless specifically requested. *Please note that the electronic files supplied will always be used to produce the illustrations, including those for the print version of the article; it is the Authors' responsibility to ensure that these files are of suitable quality.*

ORGANIZATION OF THE ARTICLE

Title page. The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding Author (as well as telephone number, facsimile number and E-mail address, and if available URL address) to whom correspondence and proofs should be sent.

Abstract. This should provide a concise description of the purpose of the report or summary of the review and should not exceed 250 words. References should therefore be avoided, but

if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. **Classification terms** (to be placed under the Abstract):

Section. One term should be selected from the 9 (sub). Section headings listed above under "Scope".

Keywords. Provide a maximum of six keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner: *For each and every* accession number cited in an article, Authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences. **Example:** "GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)". Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to the source from the article.

Research Reports and *Reviews* should be divided into **numbered sections** headed by a caption (e.g. Abstract, 1. Introduction, 2. Results, 3. Discussion, 4. Experimental Procedure, Acknowledgements, References).

Introduction. In this section, the objectives of the research should be clearly stated. Relevant background information and published studies should be described concisely, and be cited appropriately.

Results. The results should be described clearly and concisely, and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

Discussion. The results of the research should be discussed in the context of other relevant published work, and as concisely as possible. Extensive citations and discussion of published

literature should be avoided.
Experimental Procedure. This section should contain all the details necessary to reproduce the experiments. Avoid re-describing methods already published; only relevant modifications should be included in the text.

Literature references. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page, arranged in alphabetical order of first author then year of publication. The references should include only articles that are published or in press. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only. Personal communications should be documented by a letter of permission. Abstracts of work presented at meetings may not be cited. All items in the list of references should be cited in the text and, conversely, all references cited in the text must be presented in the list. The abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the *List of Serial Title Word Abbreviations*, CIEPS/ISDS, Paris, 1985 (ISBN 2-904938-02-8). Please use the following style for references:

Article in a periodical: Allan, K., Doyle, M.C., Rugg, M.D., 1996. An event related potential study of word-stem cued recall. *Cognitive Brain Res.* 4, 251-262.

Chapter in a book (within a series): Mize, R.R., 1994. Conservation of basic synaptic circuits that mediate GABA inhibition in the subcortical visual system. In *Neuroscience: From the Molecular to the Cognitive. Progress in Brain Research*, Vol. 100, F.E. Bloom, ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 123-132.

An entire book: Swanson, L.W., Bjorklund, A., Hokfelt, T., 1966, *Integrated Systems of the CNS, Part III: Cerebellum, Basal Ganglia, Olfactory System. Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam.

URLs should be included for websites that are relevant to the article.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Illustrations. Authors should consult the Elsevier website for guidelines for preparing (electronic) artwork: <http://authors.elsevier.com/artwork>. *N.B. With Web submission, only the following formats are acceptable: TIFF, PDF and EPS.* It should be borne in mind that in the journal illustrations will appear either across a single column (=8.3 cm) or a whole page (=17.6 cm). The illustrations should be numbered in Arabic numerals according to the sequence of appearance in the text, where they are referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc.

Accepted manuscripts submitted on diskette, ZIP-disk or CD-ROM that include electronic files of the illustrations must be accompanied by a hardcopy set of the final illustrations. All hardcopy illustrations should bear the author's name, the orientation (top, bottom, etc.) and be numbered. Hardcopy colour figures should be submitted as separate prints and not be mounted on cardboard.

If illustrations (or other small parts) of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to *Brain Research*, the written permission of the authors and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Colour reproduction.

On the Web: If you submit usable colour figures with your accepted article, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether they are reproduced in colour or black-and-white in the printed version of the article.

In the print journal: Authors will be required to pay a fee towards the extra costs incurred in colour reproduction in print. The charges are EURO 200.00 (approx. US\$200) per figure reproduced in colour.

Important: Should you not opt for colour in print, please submit in addition usable black-and-white prints corresponding to all the colour illustrations; this is necessary because of technical complications that can arise when converting colour figures to 'grey scale'.

Figure legends should be concise and clear and should not duplicate the body of the text. Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be placed on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the figure must be explained.

Cover illustration. Authors are encouraged to submit aesthetically interesting figures for possible publication on the front cover of an issue of the journal. The photograph should at least be related to the author's accepted article, but need not be one of the figures appearing in that article. The ideal format of a cover figure should be 25.4 x 21.4 cm for 1:1 reproduction (or any multiples of the above).

Tables. Tables should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text. Tables of numerical data should each be typed (with double-spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.) and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc. The title of the table should appear above it. A detailed description of its contents and footnotes should be given below the body of the table.

PROOFS, OFFPRINTS, MISCELLANEOUS

Proofs

Authors should keep a copy of their article as proofs will be sent to them without the manuscript. Proofs will be sent by E-mail, as PDFs. Only printer's errors may be corrected; no change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the Authors' responsibility. A form with queries from the copyeditor may accompany the proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. Corrections to the proofs must be returned by E-mail or Fax within **48 hours** after receipt. If the Publisher receives no response from the Authors after **14 days**, it will be assumed that there are no errors to correct and the article will be published.

Offprints

25 offprints of each paper will be provided free of charge to the corresponding Author. Additional copies can be ordered at prices shown on the offprint order form which will be sent to the Author upon receipt of the accepted article at the Publisher.

POLICY ISSUES

Experimental subjects.

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject.

Authors should be aware of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) which has been printed in the *British Medical Journal* (18 July 1964).

When **experimental animals** are used, the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), or with the animals for experimental procedures

For **other policy issues**, authors are referred to the policy guidelines of the Society for Neuroscience (see their website <http://www.jneurosci.org/misc/itoa.shtml>).