

NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

***MORFOMETRIA E HISTOQUÍMICA
DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS
SUBMETIDOS AO ÁLCOOL E A DESNUTRIÇÃO***

Recife, 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

***MORFOMETRIA E HISTOQUÍMICA
DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS
SUBMETIDOS AO ÁLCOOL E A DESNUTRIÇÃO***

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Nutrição do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Pernambuco para obtenção do grau de
Doutor em Nutrição

Recife, 2003

Pontes Filho, Nicodemos Teles de
Morfometria e histoquímica do córtex cerebral de
ratos jovens submetidos ao álcool e a desnutrição /

Nicodemos Teles de Pontes Filho. Recife: O Autor,
2003. 62 folhas: il.,fig., tab.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Pernambuco.CCS . Nutrição, 2003.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Histoquímica – Técnica – Uso. 2. Morfometria -
Técnica –Uso. 3. Desnutrição – Estudo experimental.
4. Alcoolismo – Estudo experimental. I. Título.

616-091.8

611.0188

CDU (2.ed.)

CDD (21.ed.)

UFPE

BC2003-301



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

***MORFOMETRIA E HISTOQUÍMICA
DO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS
SUBMETIDOS AO ÁLCOOL E A DESNUTRIÇÃO***

ORIENTADOR:

Dr. RUBEM CARLOS ARAÚJO GUEDES
Professor Titular do Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Área: Bases experimentais da Nutrição

Recife, 2003

Banca Examinadora:

Adelmar Afonso de Amorim Júnior – Anatomia – CCB/UFPE

Belmira Lara da S. Andrade da Costa – Fisiologia – CCB/UFPE

Cristóvão Wanderley Picanço-Diniz – Anatomia – CCB/UFPA

Raul Manhães de Castro – Nutrição – CCS/UFPE

Roberto José Vieira de Mello – CCS/UFPE

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) do Departamento de Nutrição, no Laboratório de Análise de Imagens do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde e no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco

Dedicatória

Aos meus pais Nicodemos e Juliêta (*in memoriam*)

Aos meus filhos Nicodemos Neto, Nicole, Neila, Rafael e Rúbia

Ao Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Aos amigos Alberto, Glória, Eloina, Henrique e Zé Carlos

Agradecimentos

Prof. Tânia Stanford e Neci - Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof. Eulálio e Lúcia Pires - IMIP e Departamento de Nutrição, CCS-UFPE

Prof. Alexandre Schuler - Laboratório de Cromatografia Instrumental - DEQ, CTG

França, Amilton, Ana e Paulino - Biotério de Nutrição

Carmelita, Mário, Laureni, Renata, Cynarha, Jorge e Vasco - Setor de Patologia, LIKA

Kátia, Ana Paula e Ângela - LAFINNT

Léo e Mendes – Departamento de Patologia, CCS

Jailma Santos Monteiro e Maria das Graças Araújo - colegas de Doutorado

ÍNDICE

Resumo	I
1 Introdução	1
1.1 O Alcoolismo materno e sua importância	1
1.2 Álcool e Sistema Nervoso	3
1.3 Álcool, desnutrição e a formação do Sistema Nervoso Central (SNC)	6
1.4 Álcool, desnutrição e produção de Óxido Nítrico (NO) no SNC	9
1.5 Modelos experimentais, alcoolismo e desnutrição	12
2 Objetivos	15
3 Material e Métodos	16
3.1 Animais	16
3.2 Protocolo experimental	16
3.2.1 Acasalamento	16
3.2.2 Grupos experimentais	17
3.2.3 Peso corporal e encefálico	18
3.2.4 Estudo morfológico	18
3.2.4.1 Perfusão e microtomia	18
3.2.4.2 Procedimento histoquímico	20
3.2.5 Análises morfométricas	21
3.2.6 Análise estatística	25
4 Resultados	25
4.1 Pesos corporal e encefálico	25
4.1.1 Evolução ponderal	25
4.1.2 Peso encefálico aos 40 dias de vida (P40)	28
4.2 Estudo morfométrico	30
4.2.1 Número de neurônios NADPH-d+	30
4.2.2 Área do soma dos neurônios NADPH-d+	30
4.2.3 Densidade dos neurônios NADPH-d+	31
4.2.4 Densidade neuroglial	31
5 Discussão	33
5.1 Efeitos do tratamento com álcool e da condição nutricional sobre os pesos corporal e encefálico	33
5.2 Efeitos do tratamento com álcool e da condição nutricional sobre o padrão morfológico do córtex cerebral	36
6 Conclusões	41

7 Perspectivas	42
Abstract	43
Referências Bibliográficas	44
Anexos	52

RESUMO

Ratos Wistar foram gerados e amamentados por matrizes submetidas a dois tratamentos nutricionais: 1) dieta padrão do biotério ("Labina", Purina do Brasil Ltda, com 23% de proteína, grupo N) e 2) dieta hipoproteica ("Dieta Básica Regional" – DBR com 8% de proteína, grupo D). Cada grupo nutricional foi subdividido em 3, conforme o tratamento, por gavagem, com água, aguardente (A) ou etanol (E), originando os 06 grupos desse trabalho, onde foram estudados o desenvolvimento do peso corporal e encefálico e o padrão citomorfológico do córtex visual através de marcação histoquímica para NADPH-d e morfometria. O estudo da evolução ponderal avaliou três períodos: 3^o (P3), 25^o (P25) e 40^o (P40) dias de vida. Em P3 apenas os grupos nutridos (A e E) tinham peso significativamente menores, quando comparados com os nutridos (N). Em P25 e P40 os grupos A e ED apresentaram significativa redução de peso quando comparados com os grupos N e D, respectivamente. Os grupos nutridos (A e E), comparados entre si, apresentaram diferença de peso significativa em P25 e P40, sendo esses mais baixo no grupo A. Entre os desnutridos (AD e ED) houve diferença estatística apenas em P25, tendo o grupo ED menor peso. Percebeu-se diferença significativa de peso na comparação de grupos com mesmo tratamento e dietas diferentes (A x AD e E x ED) em P25 e P40, tendo os grupos AD e ED os menores pesos. A comparação entre os grupos N e D mostrou que nos 3 períodos o peso médio era significativamente mais baixo no grupo D. Em relação ao peso encefálico não houve diferença entre os grupos A e E e o controle N, mas houve entre ED e D. Comparados os grupos AD e ED tinham peso menor que os grupos A e E. O peso encefálico do grupo D era estatisticamente menor que o controle (N). Cortes histológicos coronais seriados do encéfalo, obtidos de animais perfundidos aos 40 dias de vida, foram marcados para NADPH-diaforase ou corados pelo Nissl. O estudo morfométrico feito nesse material avaliou o número, a área e a densidade de neurônios NADPH-d+, e a densidade neuroglial. A condição nutricional isoladamente influenciou todos os parâmetros com exceção da densidade neuroglial. Por outro lado, o tratamento com aguardente ou etanol interferiu apenas nas medidas relacionadas às densidades, enquanto que a densidade neuroglial foi aparentemente mais acentuada na área cortical posterior. Concluiu-se que: 1) O álcool (aguardente *in natura* ou etanol) e a desnutrição, de forma isolada ou em associação, interferem no desenvolvimento perinatal de ratos jovens reduzindo o peso corporal e encefálico; 2) Ocorre modificação do padrão citomorfológico do córtex cerebral em ratos Wistar, com 40 dias de vida, observando-se que: a) a desnutrição aumenta o número, a área do soma e a densidade de neurônios NADPH-d positivos; b) o tratamento com álcool causa aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial; c) a densidade neuroglial é maior no córtex posterior; d) a interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com álcool induz aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial; e e) a interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com álcool induz aumento da área do soma de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial no córtex posterior.

1.0 Introdução

1.1 O alcoolismo materno e sua importância

Nenhuma outra substância é objeto tão freqüente de investigação científica, seja para o estudo do seu efeito sobre o organismo humano ou dos distúrbios funcionais a ele associados, como o etanol. Justifica-se o interesse, de um lado pela multiplicidade de ações tóxicas sobre órgãos e tecidos desencadeando mecanismos lesionais associados a diferentes patologias que afetam a saúde do indivíduo, e de outro pela repercussão social e econômica que o seu uso abusivo acarreta (Abel e Sokol, 1991; Koren e Nulman, 1994).

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 portanto sua função energética e tornando-se tóxico para o organismo (Brody, 1998).

O alcoolismo crônico está associado a numerosos processos patológicos que acometem diferentes órgãos, principalmente fígado, pâncreas, coração e cérebro (Palencia et al., 1994).

Em relação ao cérebro, o etanol causa importantes alterações neurobiológicas, degenerativas e adaptativas, tanto no organismo em desenvolvimento quanto no indivíduo adulto, seja ele utilizado de forma aguda ou crônica (Fada e Rossetti, 1998).

Essas alterações estão implicadas na gênese de processos patológicos neurológicos agudos e crônicos do alcoolismo, transformando o abuso do álcool e as complicações médicas pelo seu consumo excessivo, em problemas de saúde de extensão mundial (Fada e Rossetti, 1998).

Em 1980, Streissguth e colaboradores, ao publicarem revisão sobre os efeitos teratogênicos do etanol em humanos e em animais de laboratório, destacaram sua importância como causador de efeitos adversos em recém-nascidos.

Entre os agentes teratogênicos, o etanol é o mais largamente utilizado, tendo um número de consumidores com magnitude superior à de qualquer outro tóxico (Koren & Nulman, 1994).

O espectro do efeito teratogênico do álcool inclui desde o retardo de crescimento, disfunção do sistema nervoso central (SNC) e anormalidades crânio-faciais até patologias órgão-específicas. O somatório de todos esses distúrbios é denominado Síndrome do Alcoolismo Fetal (FAS), descrita por Jones & Smith (1973), que representa a mais severa expressão das malformações fetais relacionadas ao uso abusivo desse tóxico.

Na maioria das vezes, mesmo quando a FAS não se expressa, a exposição fetal ao etanol determina o nascimento de crianças com baixo peso, com redução do perímetro encefálico e capacidade de mamar reduzida (Streissguth et al., 1980). Mais tardiamente observa-se déficits funcionais menores, porém incapacitantes, tais como graus variados de retardo mental, de dificuldade de aprendizado e concentração, bem como alterações psicomotoras (Berman, 1996). Para Nulman e colaboradores (1998) o impedimento precoce da função cortical superior contribui para o surgimento de anormalidades intelectuais, sendo a atenção, a memória, a linguagem e o processamento da informação, a função aritmética e os processos auditivos os mais afetados. Bookstein e colaboradores (2002) advertem que nem sempre seres humanos adultos têm as expressões faciais características da FAS, apresentando nesses casos déficit intelectual moderado associado a déficit específicos, em graus variados, na atenção, na memória e no julgamento, além de deficiência motora. O prognóstico sócio-comportamental desses pacientes é severo, tendo Streissguth e colaboradores (1996) assinalado que a prevalência de "incapacidades secundárias" (como evasão escolar e frequência do número de incursões às prisões) é elevada.

Em 1990, o "National Institute on Drug Abuse" dos Estados Unidos divulgou estudo reportando que 61,5% das mulheres americanas haviam consumido álcool no ano anterior. O mesmo estudo revelou que o consumo era mais alto entre mulheres jovens e no período reprodutivo, no qual 75% tinham idade entre 18 e 34 anos. Posteriormente, Brody (1998) divulgou os resultados de pesquisa, desenvolvida também naquele país, sobre a frequência do nascimento de crianças com FAS. Concluiu-se que o percentual de casos variava entre 2,5 e 10% das mães alcoolistas e estava relacionado ou ao consumo agudo

intenso (5 doses em uma única ocasião) ou ao consumo crônico (em torno de 45 doses ao mês).

Embora a FAS, assim como suas formas menos severas, esteja diretamente relacionada com o alcoolismo crônico materno, alguns fatores de risco podem ser imputados como co-responsáveis pelo seu desenvolvimento. A elevada prevalência de casos nas classes sócio-econômicas mais baixas sugere que fatores tais como a desnutrição, o tabagismo e o consumo de outras drogas (maconha, cocaína, etc.) podem elevar o risco. Outros podem estar associados diretamente ao álcool, entre os mais importantes as diferenças genéticas e metabólicas, e o padrão de consumo individual (Streissguth et al., 1980; Church, 1998).

Streissguth e colaboradores (1980) afirmaram ainda, que a prevalência de FAS descrita em vários estudos envolvendo mães alcoolistas é influenciada por fatores demográficos e de seleção de amostras. Por esses motivos, embora não se tenha notificação de estudos similares da população mundial, acredita-se que a incidência da FAS seja bastante elevada, uma vez que tanto na América do Norte quanto em países europeus (França e Suécia) a população mais atingida é aquela de localidades de baixo nível sócio-econômico (Brody, 1998).

1.2 Álcool e Sistema Nervoso

Embora seja uma droga de estrutura química simples e de ação farmacológica fraca, em comparação com outras drogas de abuso, o etanol produz sem dúvida 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).

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. Nesse último caso estão incluídas: as disfunções da circulação sanguínea placentária e fetal, induzidas pelo etanol, a ação teratogênica do acetaldeído (metabólito primário do etanol), e a desnutrição materna.

As anormalidades do SNC fetal induzidas pelo álcool são, segundo West e colaboradores (1994), mediadas por múltiplos mecanismos e acometem praticamente todas as áreas cerebrais.

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 a água da matriz extracelular (Abraham et al., 1991; Barry et al., 1994; Yurittas et al., 1992).

Dickinson e colaboradores (1993) e Diamond e Gordon (1997) afirmaram que o etanol atua sobre sítios celulares, de maneira reversível ou não, provocando modificações conformacionais em enzimas, proteínas e fosfolipídios estruturais e genes.

Em curto prazo surgem alterações degenerativas celulares cerebrais decorrentes de perturbações na transdução de sinais, na permeabilidade de canais iônicos, no transporte de proteínas (Freund, 1973; Goodlett et al., 1996), na endocitose de fatores neurotróficos (Rosenberg, 1996) e na morte celular direta por hiper ou hipo-regulação de receptores (excitotoxicidade) ou apoptose (Michaelis et al., 1990; Goodlett et al., 1996; Amarante-Mendes et al., 1999; Ikonomidou et al., 2001). Os processos degenerativos induzidos por esses mecanismos tóxicos do etanol são responsáveis pelos sinais e sintomas observados nos indivíduos expostos precocemente a essa droga (Bookstein et al., 2002).

Posteriormente, aparecem as alterações morfo-funcionais, decorrentes das modificações na expressão genética, que afetam o desenvolvimento pós-natal, bem como a capacidade psicológica, comportamental e cognitiva. (Walker et al., 1980; Hunt, 1981; Eckardt et al., 1986; Wozniak et al., 1991; Milles et al., 1992; Hsieh et al., 1996; Diamond e Gordon, 1997; Guerri, 1998; Bookstein et al., 2002; Nixon e Crews, 2002).

Um dos mecanismos de toxicidade indireta do etanol sobre o cérebro é decorrente de sua ação sobre os vasos sanguíneos (Shibley et al., 1999). A circulação placentária e a circulação cerebral fetal são meios de transportes 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 condição

fisiopatológica que venha a interferir na perfusão cerebral irá comprometer o amadurecimento desse órgão (Phillips et al., 1997). No caso da circulação placentária, a exposição materna ao álcool determina bloqueio transitório da circulação umbilical, o que segundo Mukherjee e Hodgen (1982) causa o comprometimento da neuronogênese e da gliogênese, face à hipóxia fetal.

Por outro lado, Phillips e colaboradores (1996) sugeriram que alterações ou retardo no desenvolvimento dos vasos sanguíneos ou da barreira hemato-encefálica fetal, formada pelo endotélio vascular e a bainha perivascular astrocitária, poderiam alterar o aporte de fatores de crescimento e consequentemente o processo de proliferação e diferenciação das células cerebrais. Segundo eles, os mecanismos lesivos dos vasos sanguíneos são dependentes do tempo de exposição, da concentração sanguínea, e da sensibilidade variada das diversas regiões cerebrais ao etanol.

De fato, os trabalhos de Kelly e colaboradores (1990) e Mayhan e Didion (1996) destacaram a importância dos distúrbios circulatórios, induzidos pela exposição pré e pós-natal precoce ao álcool, como fator de supressão do desenvolvimento normal de diferentes regiões do SNC.

O álcool cruza a barreira placentária livremente, por ter peso molecular entre 600 e 1000 Kda, atingindo concentrações sanguíneas mais elevadas no feto que na mãe (Streissguth et al., 1996). O efeito tóxico no feto é, portanto, muito mais exacerbado uma vez que nesse não está totalmente estabelecida a função hepática. Além disso, a concentração de acetaldeído, derivado do metabolismo materno, torna-se elevada, e mais tóxica, pela formação insuficiente da enzima aldeído-desidrogenase hepática, na vida fetal (Brody, 1998).

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 folatos, tiamina, riboflavina, vitamina B6 e magnésio, principalmente quando a ingestão dessas substâncias é baixa. Nesses casos, são fatores determinantes de maior importância a anorexia induzida pelo etanol e o desvio de recursos financeiros para a compra da bebida alcoólica, em detrimento da compra de alimentos (Achord, 1998; Palencia et al., 1994).

Entretanto, a deficiência nutricional pode ser também decorrente da redução da absorção do nutriente causado 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).

Por fim, a desnutrição "in utero", determinada pelo reduzido aporte de nutrientes, pode ser agravada no recém-nascido, que sob a ação indireta do etanol reduz a capacidade de mamar (Streissguth et al., 1980; Rosenberg, 1996) e de metabolizar nutrientes em razão das alterações hepáticas que apresenta (Rosenberg, 1996).

1.3 Álcool, desnutrição e a formação do sistema nervoso central (SNC)

O desenvolvimento anatômico, químico e fisiológico do cérebro e consequentemente do comportamento, em todas as espécies superiores, é decorrente da contínua interação entre fatores genéticos e numerosos fatores ambientais, incluindo-se entre os últimos a nutrição e variáveis culturais, como o enriquecimento ambiental (Morgane et al., 1993).

Para Dobbing (1968) a etapa mais vulnerável do desenvolvimento do SNC à desnutrição, e a outros insultos, é o "período crítico de crescimento cerebral", isto é, o período de pico da atividade de eventos específicos (neurogliogênese, migração e diferenciação celular). Nos seres humanos o período vai do terceiro trimestre da gestação até o segundo ou terceiro ano de vida (pré e pós-natal), e no rato desde o nascimento até o fim do aleitamento (pós-natal), em torno do 21^o dia.

No entanto, o cérebro não é um órgão homogêneo, pois é formado por diferentes estruturas, assim suas regiões apresentam diferenças em seus ritmos de crescimento (Guedes, 1985). Tal observação foi corroborada por Morgane e colaboradores (1993) ao afirmarem que cada região cerebral, com suas coleções distintas de unidades histológicas, segue uma seqüência de desenvolvimento temporal precisa e planejada intrinsecamente, isto é, cada região cerebral tem seu próprio período crítico de crescimento.

Dessa forma, o crescimento e a organização estrutural do cérebro obedece um cronograma pré-determinado e inflexível (Guedes, 1985), sendo variavelmente vulnerável às agressões durante todo o período de desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce (Morgane et al., 1993).

Segundo Morgane e colaboradores (1993) o estágio do período de desenvolvimento em que ocorre uma agressão parece ser um fator mais decisivo na determinação do defeito final apresentado pelo cérebro do que o tipo de agressão, isto é, um mesmo insulto atuando em momentos variados determina diferentes alterações na morfofisiologia cerebral.

Em geral, a histogênese do SNC em todos os mamíferos é desenvolvida em três principais estágios:

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 proliferadas 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.

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. Em qualquer caso, os estágios posteriores de desenvolvimento que dependem dos eventos primários são afetados secundariamente.

Alguns autores sugerem que o etanol bloqueia a proliferação de precursores neuronais por interferir na ação de fatores de crescimento mitogênicos produzidos por fibroblastos e plaquetas (Luo e Miller, 1997,1998; Özer et al., 2000). 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 em grande quantidade (Morgane et al, 1993).

No que se refere à migração, tanto o álcool (Miller et al., 1993; Kenrotti et al., 1995; Özer et al., 2000) quanto à desnutrição (Winick e Rosso, 1975; DeBassio e Kemper, 1985), atuam sobre o mesmo alvo. O direcionamento e o deslocamento das células nervosas para seu habitat são dependentes da expressão de moléculas de adesão na superfície dessas células e da sua interação com a matriz extracelular. Assim, 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 tarde aos seu alvos definitivos, prejudicando a formação dos circuitos neurais.

Uma vez presente no seu destino final, 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, assim como por fatores de crescimento de origem hematogênica. Esses 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 apoptose (Mattson, et al., 1991).

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).

Vários trabalhos demonstram as ações nocivas do álcool e da desnutrição nas etapas do processo de diferenciação celular, observando-se desde o bloqueio de receptores para neurotransmissores (Chepkova et al.,1995; Gil-Martín et al.,1996), interferência no processo de mielinização (Zoeller et al.,1994; Özer et al.,2000) e na expansão e modelamento axônico e dendrítico (Scott et al.,1992; Morgane et al., 1993), até a perda neuronal (Morgane et al., 1993; Marcussen et al., 1994; Nixon e Crews, 2002).

Como se pode observar, 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 da vida em que elas incidem e da sua duração; 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 Rossetti, 1998; Morgane et al., 1993), de variada intensidade, observadas tanto em recém-nascidos quanto em adultos.

1.4 Álcool, desnutrição e produção de óxido nítrico (NO) no SNC

O óxido nítrico (NO) é um gás altamente difusível, solúvel em lipídios e produzido por diferentes tipos celulares do organismo humano e de outros animais. No cérebro, apresenta uma grande variedade de efeitos biológicos, estando implicado 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 e modula a resposta neuronal do sistema visual. Durante as etapas de desenvolvimento do sistema nervoso atua na mediação da diferenciação celular (Ogura et al., 1996), regula a sobrevivência e a morte celular (Sparrow, 1995; Wink e Mitchell, 1998; Ikonomidou et al., 2001), além de atuar como neurotransmissor com função organogênica (Nelson et al., 1997).

Por seus efeitos sobre a liberação de neurotransmissores como o glutamato, acredita-se que o NO tenha, juntamente com o monóxido de carbono, importante papel na formação da memória, no aprendizado, na agressividade e sexualidade (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 síntese da NOS é regulada por 3 diferentes genes, podem ser produzidas três diferentes isoformas desta enzima (Wink e Mitchell, 1998).

Duas delas, NOS-1 ou neuronal (nNOS) e NOS-3 ou endotelial (eNOS) são constitutivas, isto é, produzidas continuamente pelas células, têm efeito transitório, 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. Esta 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 Mitchell, 1998).

Astrócitos, 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 (Paakkari & Lindsberg, 1995). O NO produzido pelos astrócitos e pelas terminações nervosas favorecem a adequação entre o fluxo sanguíneo vascular e a função parenquimatosa, já que os astrócitos fazem parte da bainha perivascular cerebral que regula a passagem de substâncias do sangue para o interstício cerebral (Phillips et al., 1997). Por

outro lado, o NO microglial representa uma forma de proteção do cérebro contra infecções e tumores (Paakkari & Lindsberg, 1995).

Essas diferentes isoformas de NOS têm sido caracterizadas e purificadas no cérebro em neurônios, células endoteliais, macrófagos e em astrócitos. Como todas elas são hemoproteínas que requerem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e O_2 para a produção de NO, podem ser identificadas através da reação histoquímica da NADPH-diaforase (NADPH-d), indicadora da atividade catalítica da NOS (Gonzalez-Hernandez et al., 1996; Gabbot e Bacon, 1996).

Outras técnicas mais refinadas podem ser usadas para indicar a expressão celular de NOS, tais como a imunocitoquímica (demonstra a presença da NOS proteica) ou hibridização in situ (revela o RNA mensageiro - mRNA) (Freitas et al., 2002).

A enzima NOS é geralmente mencionada como uma NADPH-diaforase (Fang et al., 1994) sendo o termo "diaforase" meramente indicativo de qualquer enzima capaz de catalizar a oxidação do NADPH para qualquer aceptor artificial de elétron, como o sal tetrazolium, que é convertido em formazan insolúvel de coloração azul escura (Freitas et al., 2002).

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 neurônios NADPH-d positivos (produtores de NO), que foram primeiramente descritos por Thomas e Pearse em 1964 (segundo Dawson e Dawson, 1996), são corados em azul escuro na presença de NADPH e nitroblue tetrazolium (NBT), sendo resistentes a uma grande variedade de insultos neurotóxicos. Tais neurônios são classificados em duas categorias. Os do Tipo I apresentam-se intensamente corados e com um rico padrão de detalhes morfológicos assemelhando-se aos corados pelo Golgi, representando apenas 2% de todos os neurônios corticais. Ao contrário, os do Tipo II são mais numerosos e fracamente corados. Esse último tipo neuronal não é observado em vertebrados inferiores, nem em algumas espécies de mamíferos tais como o camundongo e rato (Franca et al., 2000).

Comparando a produção de NOS-1, em diferentes regiões cerebrais do rato, através das técnicas de NADPH-d, mRNA e hibridização in situ, Dawson e Dawson (1996) observaram que a maior densidade da expressão da enzima ocorria no bulbo olfatório acessório, no núcleo pontino e no cerebelo. Moderada

intensidade foi apontada no giro dentado do hipocampo, bulbo olfatório principal, colículo superior e inferior, e no núcleo supra-óptico. No córtex, no núcleo caudado e putamen visualizava-se apenas células isoladas e intensamente coradas. Um aspecto interessante, observado por esses autores, é que algumas regiões como a camada molecular do cerebelo, e a neurópila do núcleo caudado-putamen e o córtex que são ricas em NOS-1, revelada pela imunocitoquímica e pela histoquímica, não se positivam pela pesquisa de NOS mRNA (hibridização). Sugerem eles, que a NOS-1 presente nessas regiões seria transportada para fibras nervosas distantes a partir do sítio de sua síntese. Esse aspecto demonstra que embora algumas regiões cerebrais, como o córtex, sejam pouco povoadas por neurônios NADPH-d positivos nelas pode ocorrer síntese e liberação de NO.

No cérebro do rato, o córtex visual está localizado na superfície dorsal da porção occipital do hemisfério cerebral. Tanto nessa área quanto em todo o córtex é possível a observação de neurônios NADPH-d positivos já ao nascimento. Por volta da segunda semana de vida o padrão morfológico é igual ao do animal adulto, tanto em número quanto em distribuição (Yan et al., 1994).

O etanol interfere na expressão das isoformas de NOS constitutivas (NOS-1 e NOS-3) e induzível (NOS-2) tanto in vivo quanto in vitro (Syapin, 1998). Em diferentes concentrações e espécies animais a exposição aguda ao etanol suprime a produção de NOS-1, sendo uma das vias de bloqueio da sua síntese a inibição de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que impedem a conseqüente ligação cálcio-calmodulina (Dildy e Leslie, 1989). Também na exposição crônica o etanol altera a atividade da NOS-1, como demonstrado por Fitzgerald e colaboradores (1995) que tratando ratos com uma dieta alcoólica líquida observaram alterações do nível da enzima em várias regiões cerebrais, principalmente no córtex fronto-parietal, no hipocampo e no estriato, cuja redução variou entre 25 e 50%.

Essas alterações na cinética da produção de NOS-1 têm repercussão funcional, como demonstrado por Kimura e colaboradores (1996). Esses autores, estudando fetos maduros de cobaias expostas cronicamente ao etanol durante a gestação, observaram prejuízo no desenvolvimento do hipocampo.

Da mesma forma a desnutrição, associada ou não ao etanol, interfere na produção de NO. Trabalhos experimentais demonstram 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 a desnutrição perinatal.

1.5 Modelos experimentais, alcoolismo e desnutrição

Estudos clínicos realizados por Lieber et al., 1965; Reynolds et al., 1965; Farrow et al., 1987; e Achord et al., 1988, não foram conclusivos quanto ao papel da desnutrição como co-fator da ação tóxica do etanol. As dificuldades encontradas se relacionavam aos parâmetros utilizados para avaliar a condição de nutrição (tipo de desnutrição e quantidade dos nutrientes consumidos) e do consumo de etanol (tipo de bebida alcoólica, padrão de consumo), assim como as condições sócio-econômicas da população estudada.

Já em 1980, Streissguth e colaboradores referiam-se à importância dos ensaios em animais de laboratório submetidos a ação tóxica do etanol, afirmando que esses em grande parte esclareciam a questão nutricional. Segundo eles, os resultados obtidos com protocolos experimentais onde foram usados controles com alimentação pareada, isto é, com compensação dietética isocalórica para substituir as calorias vazias fornecidas pelo etanol, sugeriam que o etanol era o agente teratogênico primário e não a nutrição deficiente. Posteriormente, as afirmativas desses autores foram corroboradas por outros pesquisadores, tais como Tavares do Carmo e colaboradores (1996) e Church e colaboradores (1998) que confirmaram a interferência do etanol no metabolismo lipídico, proteico e de minerais no período perinatal.

Adeptos da utilização de modelos animais, Palencia e colaboradores (1994) destacaram a importância dos trabalhos efetuados em países subdesenvolvidos nos quais o alcoolismo é superposto a um substrato metabólico de desnutrição crônica. Na concepção desses autores, esses distúrbios não têm uma relação de causa e efeito, sendo sim um somatório de duas entidades diferentes, porém comuns em populações de baixa renda. Tentando reproduzir as condições reais de alcoolismo e desnutrição típica de populações de baixa renda do México, esses autores desenvolveram um experimento com ratos jovens submetidos a uma dieta hipoprotéica (tortilla) e a ingestão de bebida fermentada e destilada

(brandy) contendo 38% de etanol. Os resultados obtidos levaram os autores a concluir que os danos induzidos pelo alcoolismo e desnutrição isoladamente eram similares, enquanto que a sua combinação acentuava as alterações dos parâmetros estudados: peso corporal, contagem de leucócitos e principalmente lesões degenerativas de várias áreas do SNC, particularmente córtex, gânglios basais e cerebelo.

O comportamento nutricional da população mexicana de baixa renda apontado por Palencia e colaboradores (1994) parece ser muito similar aos da população de mesma condição sócio-econômica do nordeste brasileiro; embora nessa última, sejam inexistentes os trabalhos científicos referentes ao padrão de consumo de bebidas alcoólicas. No entanto em relação à desnutrição, Teodósio e colaboradores (1990) desenvolveram um modelo experimental baseado na dieta consumida por populações economicamente desfavorecidas da Zona da Mata de Pernambuco. Essa dieta, denominada Dieta básica regional (DBR), contém os ingredientes básicos da alimentação dessas populações, caracterizando-se principalmente pelo déficit protéico, pois contém apenas cerca de 8% de proteínas, sendo a maioria de origem vegetal. Segundo os autores, o uso de dietas experimentais como a DBR, similares em quantidade e qualidade às aquelas consumidas por determinadas populações humanas, é útil na avaliação dos efeitos de tais dietas sobre o estado nutricional. E ainda, diminui as dificuldades encontradas quando se deseja extrapolar os dados laboratoriais para seres humanos.

Embora não haja referência sobre o padrão de consumo de bebidas alcoólicas pela população de baixa renda do nordeste brasileiro, nem sobre se tal hábito é comum a mulheres em período reprodutivo, sabemos que é prática bastante difundida nessa região a ingestão de bebida alcoólica extraída da cana-de-açúcar denominada "aguardente" com teor de etanol em torno de 42%. Se tal prática estiver presente e for significativa nessa população específica, como parece ser, pode-se prever as repercussões no desenvolvimento de crianças submetidas ao efeito tóxico do etanol e a desnutrição durante o período neonatal.

Assim, mesmo reconhecendo a necessidade de ter prudência quando da avaliação dos resultados obtidos através de modelos experimentais e sua extrapolação para os seres humanos, pareceu-nos oportuno o desenvolvimento de um protocolo experimental utilizando as condições nutricionais patológicas

acima referidas. Para tal finalidade baseamo-nos na hipótese de que ratas, nutridas ou desnutridas, expostas de forma crônica à aguardente, durante a gestação e o aleitamento, dão origem a filhotes com alterações quantitativas e qualitativas de populações celulares do SNC.

Nesse contexto, apoiamo-nos na afirmativa de Hanningan (1996) que destaca que “a meta da pesquisa animal não é simplesmente mostrar que fetos de roedores podem reagir ao álcool como os fetos humanos fazem; é, sim, estudar a natureza das reações comuns ao álcool, para identificar fatores de risco, para descobrir mecanismos e explorar potenciais tratamentos”.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar alterações do peso corporal e morfológicas no encéfalo de ratos machos jovens, procriados por mães expostas à aguardente, ao etanol e à dieta DBR, durante a gestação e o aleitamento.

2.2 Objetivos específicos

Averiguar a interferência dos tratamentos e da DBR sobre:

- ✓ a evolução do peso corporal dos filhotes;
- ✓ o peso do encéfalo de ratos jovens;
- ✓ parâmetros morfométricos em cortes histológicos de uma área cortical visual (área 17) e outra não visual (frontal):
 1. Número de células NADPH-d positivas;
 2. Área do soma dos neurônios NADPH-d +;
 3. Densidade dos neurônios NADPH-d +;
 4. Densidade neuroglial das células coradas pelo cresil violeta.

3.0 Material e Métodos

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 235 g). Desses 84 ratos foram obtidos os pesos corporais nos dias 3, 25 e 40 da vida pós-natal, bem como os pesos encefálicos no dia 40. Contudo, os dados para o estudo morfométrico foram obtidos em 30 a 39 desses animais, por limitações materiais e temporais.

Os animais, da linhagem Wistar e 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.

O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de ética em experimentação animal (CCB-UFPE – ofício 119/2003) (**Anexo 1**)

3.2 Protocolo experimental

3.2.1 Acasalamento

Para o acasalamento foram colocadas em cada gaiola 3 fêmeas e 1 macho. A prenhez era confirmada pela identificação de células descamativas, muco gestacional e espermatozóides 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. Do ponto de vista da reprodutibilidade, o método mostrou-se satisfatório ocorrendo apenas 3 exames falso-negativos no total (42) de fêmeas acasaladas. 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 macroscópico 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.

3.2.2 Grupos experimentais

Confirmada a prenhez, as matrizes foram separadas de acordo com o protocolo experimental, no máximo 02 por gaiola, e ali mantidas até o 18º dia de 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® ou Dieta básica regional – DBR, 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 9:00 horas da manhã. Os filhotes das matrizes assim tratadas originaram os 6 grupos experimentais desse trabalho, descritos a seguir:

NUTRIDO (N) (n=14) – oriundos de mães mantidas com a ração LABINA® (**Anexo 2**) e recebendo doses de 3,8 ml de água filtrada. Assim, as matrizes desse grupo foram submetidas ao mesmo estresse, causado pela contenção e gavagem, sofrido pelas gestantes dos demais grupos;

AGUARDENTE NUTRIDO (A) (n=10) – procriados por mães alimentadas com LABINA® e recebendo 3,8 ml de aguardente comercial *in natura* (**Anexo 3**);

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 Etílico Absoluto P.A. – VETEC® - Lote: 013471) (**Anexo 3**);

DESNUTRIDO (D) (n=14) – gerados por mães mantidas com a dieta DBR (**Anexo 4**) e recebendo, também, 3,8 ml de água filtrada;

AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD) (n=16) – originados por matrizes alimentadas com DBR e tratadas com aguardente;

ETANOL DESNUTRIDO (ED) (n=15) – gerados por matrizes alimentadas com DBR e recebendo etanol;

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. A padronização do tamanho da ninhada teve como objetivo eliminar a desnutrição induzida por grandes ninhadas durante a lactação (De Luca et al., 1977).

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).

3.2.3 Peso corporal e encefálico

Os animais foram pesados no 3º dia após o nascimento (**P3**), no final da lactação (**P25**) e aos 40 dias de vida (**P40**), utilizando-se balança eletrônica (Marte, modelo S-000).

A opção pela pesagem a partir do 3º dia após o nascimento foi decorrente da observação de aumento da agressividade e canibalismo entre as matrizes submetidas ao tratamento com aguardente, etanol e DBR, quando os filhotes eram manipulados nos 2 primeiros dias de vida.

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

3.2.4 Estudo Morfológico

3.2.4.1 Perfusão e microtomia

Aos 40 dias de vida os filhotes foram pesados e anestesiados, por via intraperitonal, com solução aquosa contendo uma mistura de Uretana a 10% (1g/Kg) e Cloralose a 0,4% (40 mg/Kg) de acordo com o peso corporal. Para execução da perfusão procedeu-se ampla abertura do tórax para exposição do coração. Após a injeção de 0,1 ml de heparina (Liquemine®) no ventrículo esquerdo, para evitar a coagulação sangüínea, 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 de 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 à abertura do crânio retirou-se o encéfalo e excluíram-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 tampão fosfato 0,1M preservando-o, em geladeira, até a microtomia. A microtomia foi executada sempre entre 12 e 24 horas após a perfusão.

No momento anterior à microtomia, o encéfalo foi dividido em 3 partes, mediante 2 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.

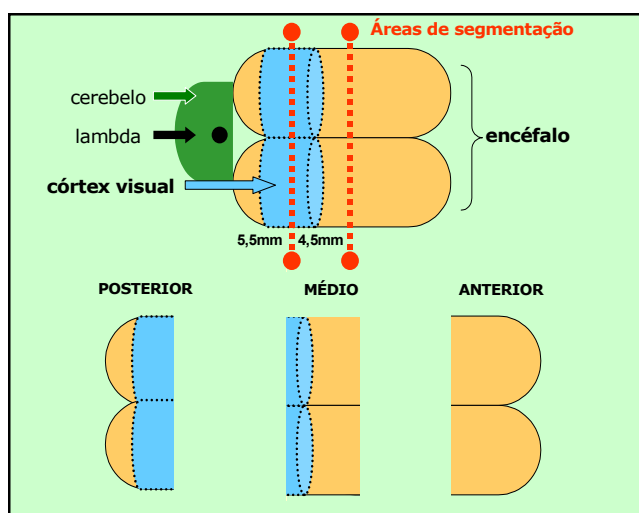


Figura 1 – Esquema da segmentação para obtenção de fragmentos encefálicos coronais (vista superior)

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 fragmento médio iniciava-se no bordo da superfície de corte voltada para o fragmento posterior indo até outra superfície de corte distante 4,5 mm, também voltada para a parte anterior do encéfalo.

Finalmente, o fragmento anterior era constituído pelo segmento iniciado no bordo da superfície de corte voltada para o fragmento médio e contendo o restante do encéfalo anterior.

Esse procedimento foi adotado para a obtenção de cortes histológicos coronais seriados do córtex posterior (fragmento posterior) e de uma região do córtex frontal (fragmento anterior), não visual, para efeitos comparativos (**Figura 2**).

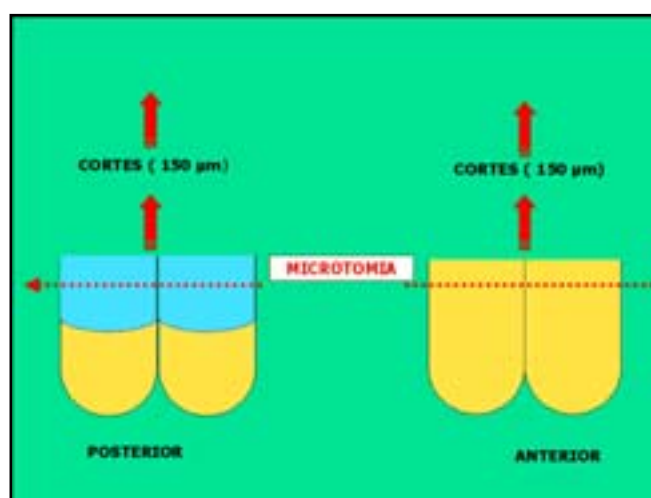


Figura 2 - Esquema dos planos de microtomia obtenção dos cortes histológicos coronais seriados

3.2.4.2 Procedimento histoquímico

Para a marcação histoquímica da NADPH-diaforase, utilizando-se um vibrátomo (Microslicer D.S.K. - Dosaka E. M. CO. LTD - Modelo DKT 3000W), obtinha-se os 4 (quatro) primeiros cortes histológicos seriados, com espessura de 150 µm, a partir da superfície de corte do fragmento posterior (córtex posterior), executando-se o mesmo procedimento com o fragmento anterior (córtex frontal). 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 anterior e posterior remanescentes foram retirados do vibrátomo, colocados em formaldeído a 10% diluído em salina a 0,9%, durante 48 horas, submetidos a rotina histológica e emblocados em parafina. Após esse processamento executou-se a microtomia (Microtomo Yamato Koki, modelo horizontal), obtendo-se novamente os 4 primeiros cortes histológicos seriados de cada fragmento, com espessura de 4 μm , que foram corados pelo método do cresil Violeta acético (coloração de Nissl).

Empregou-se 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 3,5ml de volume). Em cada poço foi colocado um corte histológico imerso em 0,5 ml da solução de marcação (**Anexo 5**). 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 dendritos 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 0,1M 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.

3.2.5 Análises Morfométricas

Os critérios utilizados na seleção das lâminas para as análises morfométricas foram a integridade do corte histológico, a boa marcação da NADPH-d na neurópila e nas células, a coloração homogênea pelo cresil violeta (**Figura 3**), e o reconhecimento dos limites do córtex, que foi realizado através de comparação com um atlas estereotático (Paxinos e Watson, 1998).

A partir dessas lâminas efetuou-se as seguintes medidas:

1. Número de neurônios NADPH-d+;
2. Área do soma dos neurônios NADPH-d+;

3. Densidade dos neurônios NADPH-d+; e
4. Densidade neuroglial das células coradas pelo cresil violeta.

Para o cálculo do número de neurônios NADPH-d+ foram selecionadas lâminas de 39 animais, contando-se essas células em 8 cortes histológicos de cada animal (4 do córtex posterior e 4 do córtex frontal). Um total de 312 cortes foram analisados sendo 64 do grupo nutrido, 56 do desnutrido, 48 do aguardente, 40 do aguardente desnutrido, 48 do etanol; e 56 do etanol desnutrido, respectivamente.

Na contagem empregou-se um microscópio óptico (Olympus, modelo BH2) e um contador manual. O observador visualizava a fissura longitudinal, divisora dos hemisférios cerebrais, e a partir dali executava a contagem (magnificação 100x) dos neurônios NADPH-d + presentes na substância cinzenta do córtex, seguindo em direção à área lateral inferior. A contagem foi feita por hemisfério, iniciando-se a leitura sempre pelo hemisfério esquerdo. As leituras foram feitas por dois observadores devidamente treinados que trabalharam em momentos diferentes. Esses observadores receberam uma caixa porta-lâminas numerada onde as lâminas histológicas selecionadas dos 6 grupos experimentais estudados foram armazenadas aleatoriamente. A superfície fosca das lâminas contendo a identificação foi recoberta com etiqueta de forma a impedir a sua leitura. Procedidas as contagens efetuava-se a identificação e o registo das contagens individuais. Os valores das contagens feitas pelos observadores individualmente foram comparados estatisticamente não havendo diferença significativa.

Os cortes histológicos empregados para análise da densidade celular e da área do soma foram examinados utilizando-se um microcomputador com programas de controle de captura e análise automáticas de imagens (Bioscan®, Image hyperlink® e Optimetric®) interligado a uma câmara de vídeo JVC, modelo CV – 730, e essa a um microscópio (Leica, modelo ATC 2000). Nesse sistema as imagens coloridas captadas e digitalizadas foram convertidas em imagens com diferentes tonalidades de cinza e arquivadas. Para o estudo de determinada imagem de interesse executava-se a transformação da imagem cinza em uma imagem bidimensional (2D) bem delimitada. Dessa forma, foi possível medir a imagem (2D) em pixels, e converter o valor da leitura automaticamente para a unidade de medida desejada conforme o aumento conferido pelo microscópio. As

funções matemáticas para medidas morfológicas, tais como densidade celular e área do soma, foram executadas automaticamente por um programa (Optimas[®] macros, 1996, Optimas Corporation, Washington, USA) com linguagem orientada para leitura de imagem, instalada no microcomputador.

A metodologia acima descrita foi utilizada para calcular a densidade celular. Para isso, selecionou-se lâminas de 5 animais de cada grupo experimental analisando-se 8 cortes histológicos de cada animal (4 do córtex posterior e 4 do córtex frontal). O procedimento foi feito tanto nos cortes histológicos marcados para NADPH-d quanto nos corados pelo cresil violeta, totalizando 480 cortes, isto é, 2.880 áreas estudadas.

Em cada corte histológico captava-se aleatoriamente imagens (magnificação 100x) de 3 áreas (medindo cada uma delas 512 x 512 pixels = 12.234 μm^2) da substância cinzenta cortical de cada hemisfério cerebral. A primeira área captada era a da porção mais próxima à fissura longitudinal, a segunda da porção latero-medial e a terceira da parte lateral inferior do córtex. Depois de digitalizadas as imagens, contava-se automaticamente a quantidade de células por área obtendo-se a densidade definida como o número de células/área em μm^2 . As médias das densidades das 3 áreas foram tomadas para efeito comparativo.

As mesmas lâminas utilizadas para avaliar a densidade celular foram usadas para as medidas da área do soma dos neurônios NADPH-d+, porém nesse caso analisou-se 2 cortes histológicos de cada animal (1 do córtex posterior e 1 do córtex frontal).

Em cada corte histológico foram medidos os perfis celulares de 20 neurônios da substância cinzenta cortical (10 de cada hemisfério cerebral) escolhidos aleatoriamente (magnificação 400X), perfazendo um total de 1.200 células medidas. Depois de digitalizada a imagem da célula obtinha-se automaticamente, através do sistema de análise de imagem a área do soma em μm^2 . As médias das áreas foram tomadas para efeito comparativo.

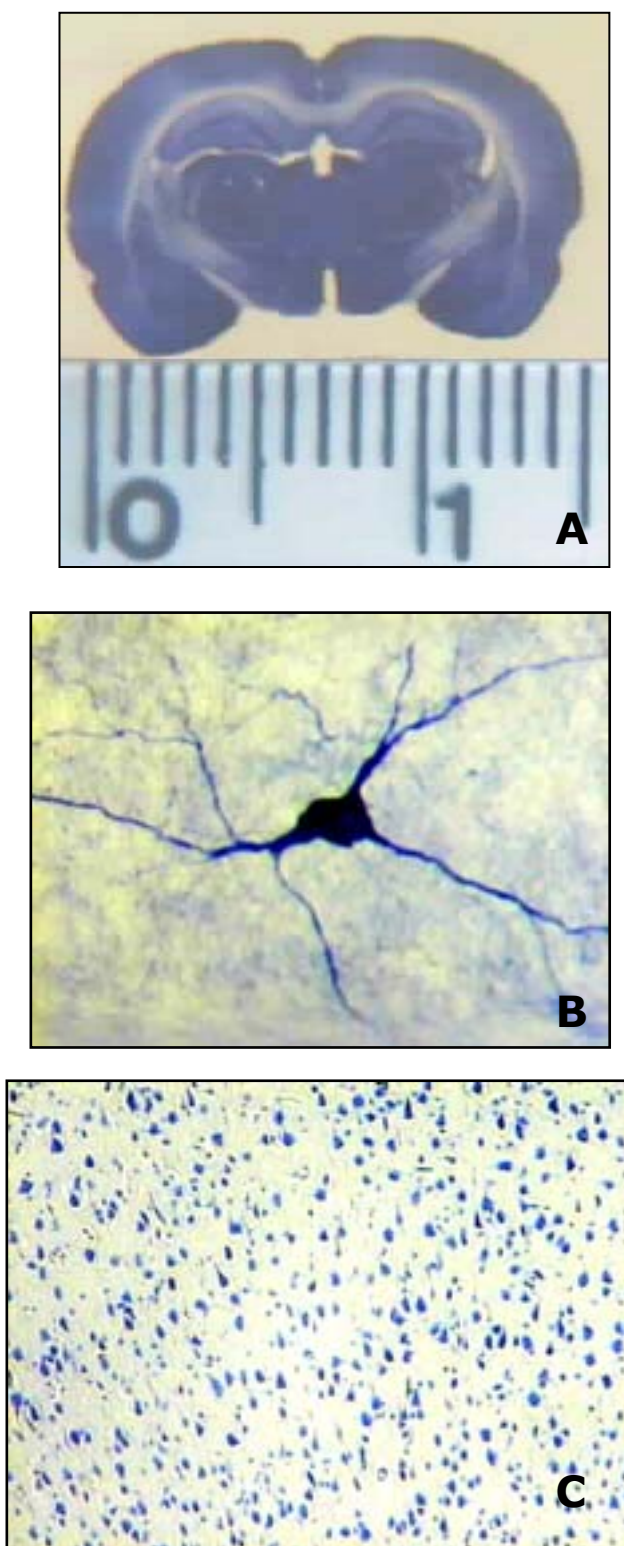


Figura 3 – Perfil macroscópico ilustrando corte histológico coronal do córtex posterior marcado para NADPH-d (**A**), e fotomicrografias do corpo celular de neurônios NADPH-d+ (**B**) 400x, e das células neurogliais marcadas pelo cresil violeta (**C**) 100x

3.2.6 Análise Estatística

A ANOVA uni-lateral (one-way) foi empregada para comparar os pesos corporais e encefálicos entre animais de grupos e tratamentos diferentes. Nas comparações em que a ANOVA apontava diferenças significativas utilizou-se o teste de Spjotvoll e Stoline para comparações múltiplas. Por outro lado, para análise dos dados morfométricos utilizou-se a ANOVA bi-lateral (two-way), para medidas repetidas, considerando-se a influência dos fatores isoladamente (efeitos principais) e da interação entre dois ou mais fatores. Em todos os casos, considerou-se como nível de significância para rejeição da hipótese nula um valor de $p < 0,05$.

4.0 Resultados

4.1 Pesos Corporal e Encefálico

4.1.1 Evolução ponderal

Para o estudo da evolução ponderal analisou-se o peso corporal dos filhotes, gerados por mães nutridas ou desnutridas submetidas a três tratamentos (água, aguardente ou etanol), em 3 períodos distintos. Para tal finalidade, optou-se pela comparação dos pesos médios no 3º dia de vida (**P3**) (pós-natal precoce), no 25º dia (**P25**) (final da amamentação) e 40º dia (**P40**) (pós-natal tardio) (**Anexo 6**).

Quando foram comparados com o grupo nutrido (**N**), os grupos aguardente (**A**) e etanol (**E**) apresentaram pesos significativamente menores ($p < 0,05$) no período **P3**, enquanto que nos períodos **P25** e **P40** apenas o peso médio do grupo **A** diferiu estatisticamente. Comparados entre si, os grupos **A** e **E** diferiram significativamente nos períodos **P25** e **P40**, tendo menor peso médio o grupo **A**.

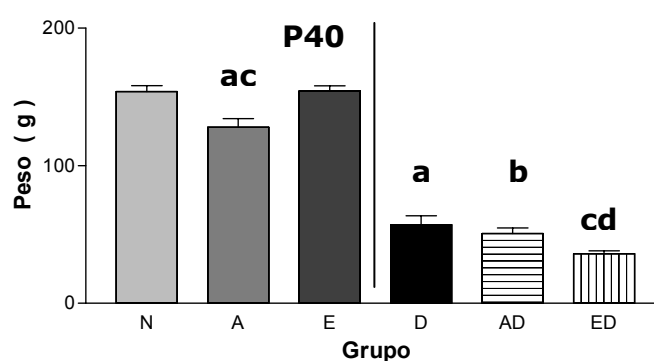
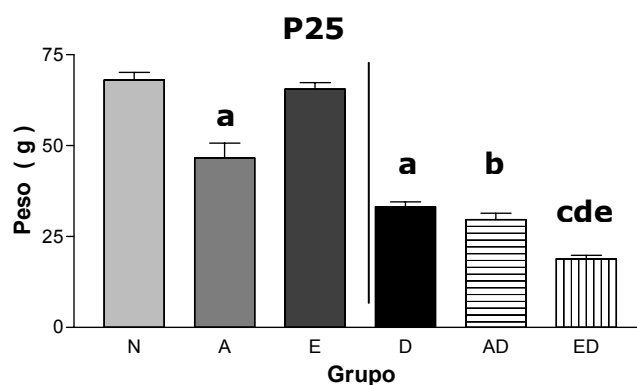
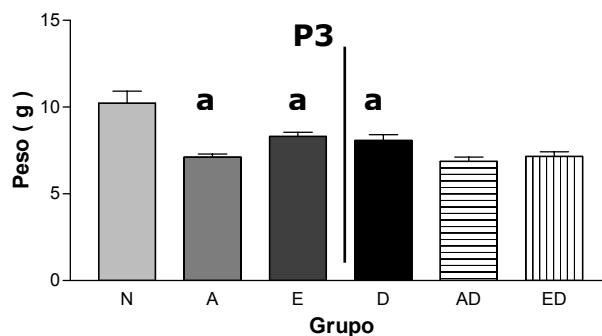
Entre os desnutridos, observou-se que os grupos aguardente desnutrido (**AD**) e etanol desnutrido (**ED**) não diferiam estatisticamente em **P3** quando comparados com o grupo desnutrido (**D**), porém em **P25** e **P40** o grupo etanol desnutrido (**ED**) tinha peso médio significativamente mais baixo. Comparados entre si, os grupos **AD** e **ED** apresentaram diferença significativa apenas em **P25**.

Por outro lado, a comparação entre grupos com o mesmo tratamento porém com dietas diferentes, isto é, **A x AD** e **E x ED**, demonstrou que a diferença de peso era significativa nos períodos **P25** e **P40**.

Finalmente a análise relacionada apenas à dieta empregada, mostrou que nos 3 períodos estudados o peso médio dos grupos nutrido (**N**) e desnutrido (**D**) diferiam significativamente entre si, sendo mais baixos nesse último (**Figura 4**).

Figura 4 - Evolução ponderal (média $\pm$ desvio padrão) nos 3^o (**P3**), 25^o (**P25**) e 40^o (**P40**) dias de vida de ratos machos Wistar, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8

ml/dia de água (grupos - **N**, n=14 e **D**, n=14), aguardente (grupos - **A**, n=10 e **AD**, n=16) ou etanol (3g/kg - grupos **E**, n=15 e **ED**, n=15). Foi utilizada a ANOVA one-way para avaliar as diferenças entre os grupos, seguida do teste de Spjotvoll e Stoline para as comparações múltiplas.



a = diferente do grupo N

b = diferente do grupo A

c = diferente do grupo E

d = diferente do grupo D

e = diferente do grupo AD

p<0,05

4.1.2 Peso encefálico aos 40 dias de vida (P40)

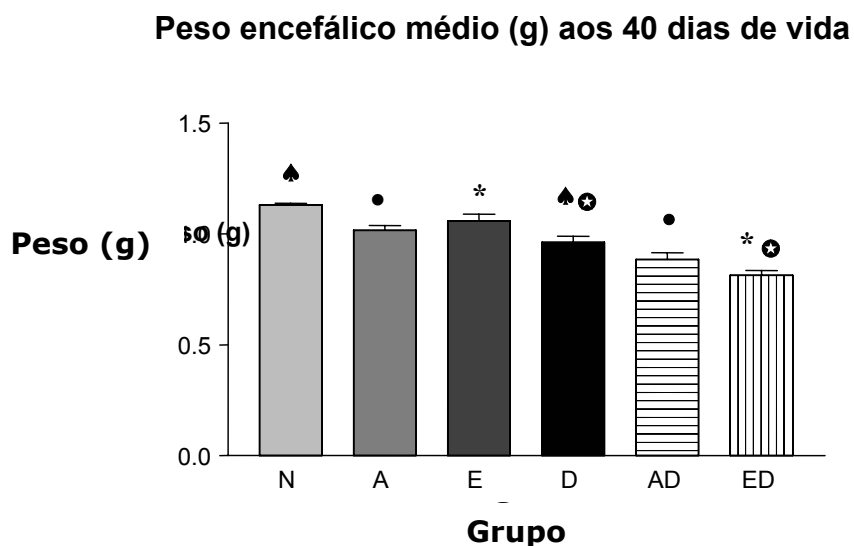
A análise dos valores médios (**Anexo 7**) relativos ao peso encefálico aos 40 dias de vida (**P40**) demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos **A** e **E** quando comparados com o grupo nutrido (**N**), ou quando comparados entre si.

Em relação aos desnutridos observou-se diferença significativa apenas entre os grupos **D** e **ED**.

Por outro lado, a comparação entre grupos com o mesmo tratamento, porém com dietas diferentes, isto é, **A** x **AD** e **E** x **ED**, demonstrou que a diferença de peso era significativa.

Finalmente, a comparação entre os grupos com dietas diferentes e não tratados (**N** x **D**) permitiu observar que o peso encefálico do grupo **D** era estatisticamente menor que o grupo **N** (**Figura 5**).

Figura 5 - Peso encefálico (média $\pm$ desvio padrão) no 40^o (P40) dia de vida de ratos machos Wistar, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos - N, n=14 e D, n=14), aguardente (grupos - A, n=10 e AD, n=16) ou etanol (3g/kg - grupos E, n=15 e ED, n=15). Os grupos com símbolos iguais diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$). Foi utilizada a ANOVA one-way para avaliar as diferenças entre os grupos, seguida do teste de Spjotvoll e Stoline para as comparações múltiplas.



4.2 Estudo morfométrico

Como descrito em “análise estatística” (3.2.6.), os dados referentes ao estudo morfométrico foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA “two way”). Dessa forma, os resultados apresentados a seguir referem-se a análise estatística dos efeitos isoladamente (**efeitos principais**), isto é, condição nutricional (nutrido ou desnutrido), tratamento (água, aguardente ou etanol) e tipo de córtex (posterior ou frontal). A influência da associação (**interação**) de dois ou mais efeitos também foi analisada. Esse tratamento estatístico, no entanto, não permitiu a avaliação do grau de interação entre os efeitos. Um resumo das diferenças morfométricas descritas a seguir (itens 4.2.1 a 4.2.4) está na **tabela 1**.

4.2.1 Número de neurônios NADPH-d+ (Anexo 8)

O tratamento estatístico empregado para avaliar o efeito condição nutricional isolado sobre o número de neurônios marcados entre os grupos **N** e **D**, maior entre os desnutridos, revelou existir diferença significativa.

Ao contrário, observou-se que os efeitos tratamento ou tipo de córtex não tinham influência sobre a quantidade dessas células.

Na avaliação da interação de dois ou mais efeitos também não foi observada diferença significativa.

4.2.2 Área do soma dos neurônios NADPH-d+ (Anexo 9)

A área do soma dos neurônios NADPH-d+ apresentou-se significativamente maior no grupo **D** quando comparado ao grupo **N**, demonstrando haver influência do efeito condição nutricional, isoladamente, sobre o tamanho celular. Essa influência, no entanto, não foi significativa quando se avaliou o efeito tratamento e tipo de córtex, também isoladamente. No entanto, o estudo da interação entre esses efeitos mostrou existir diferença estatística entre as áreas do corpo celular, assim como quando interagiam os três efeitos.

4.2.3 Densidade dos neurônios NADPH-d+ (Anexo 10)

A densidade de neurônios marcados para NADPH-d+ foi significativamente alterada pelos efeitos condição nutricional e tratamento, tanto isoladamente quanto pela interação dos dois efeitos. Nesse caso, observou-se que a densidade celular era maior entre os desnutridos e tratados. Ao contrário, a densidade celular não diferiu estatisticamente em relação ao tipo de córtex ou ainda quando esse efeito interagia com a condição nutricional ou o tratamento. Observou-se ainda que a interação dos três efeitos não teve influência sobre a densidade dos neurônios estudados.

4.2.4 Densidade neuroglial (Anexo 11)

O estudo estatístico pela "ANOVA two way" demonstrou não haver efeito da condição nutricional, isoladamente, na densidade das células neuronais e gliais. Em relação ao tratamento, os grupo A quanto o E apresentaram densidade maior que o controle (N); Entre os desnutridos houve maior densidade do grupo ED e menor no grupo AD em relação ao grupo (D). Também em relação ao tipo de córtex observou-se uma densidade neuroglial maior na área posterior, com exceção do grupo (A) onde não houve diferença. Quanto à interação dos efeitos, observou-se que essa é significativa apenas na associação condição nutricional - tratamento e na associação dos três efeitos.

Tabela 1 - Sumário da ANOVA two way para análise estatística da influência dos **efeitos principais** e das **interações** sobre **parâmetros morfológicos** em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água, aguardente ou etanol (3g/kg).

PARÂMETRO MORFOLÓGICO	Nº de neurônios NADPH-d+	Área do soma de neurônios NADPH-d+ (μm^2)	Densidade de neurônios NADPH-d+ (Área = $12.234\mu\text{m}^2$)	Densidade neuroglial (Área = $12.234\mu\text{m}^2$)
EFEITO PRINCIPAL	Valores de p*			
1. Condição nutricional	0,000214*	0,000000*	0,000000*	0,113065
2. Tratamento	0,282381	0,437019	0,006327*	0,000000*
3. Tipo de córtex	0,433052	0,233407	0,512927	0,000004*
INTERAÇÃO				
1 + 2	0,209375	0,110658	0,000006*	0,000000*
1 + 3	0,082678	0,445785	0,724367	0,095197
2 + 3	0,236372	0,009723*	0,830204	0,940931
1 + 2 + 3	0,143708	0,025346*	0,138267	0,006343*

*($p < 0,05$)

5 Discussão

5.1 Efeitos do tratamento com álcool e da condição nutricional sobre os pesos corporal e encefálico

Os resultados obtidos no nosso trabalho indicam que, de modo geral e nos períodos estudados, houve interferência da aguardente e do etanol no peso corporal e encefálico, tanto em animais nutridos quanto em desnutridos.

Em relação aos efeitos do tratamento durante a gestação (P3) observou-se concordância dos nossos resultados com aqueles obtidos por Abel e Hanningan (1996). Nesse caso, os animais nutridos que receberam aguardente ou etanol tinham peso menor que os tratados com água. Como não houve diferença estatística entre os pesos dos animais tratados nutridos (A e E) e desnutridos (AD e ED) entre si, supomos que a diminuição do peso em P3 (pós-natal precoce) foi decorrente dos efeitos indiretos do álcool relacionados a mãe. O trabalho de Shibley e colaboradores (1999) pareceu-nos fundamentar essa hipótese, já que nele os autores afirmam que o etanol interfere em todas as três fases da nutrição fetal, isto é, a nutrição materna, a transferência placentária e o metabolismo fetal, aspectos esses já abordados na introdução. No contexto da nutrição materna alguns autores (Palencia et al., 1994; Achord, 1988 e Brody, 1998) enfatizam a anorexia como importante fator de desnutrição. No nosso experimento, percebemos que durante a gestação algumas matrizes demonstravam irritabilidade no momento da gavagem para administração do álcool (aguardente ou etanol), além de apresentarem sinais de embriaguez e demora na recuperação desta. Tais condições, em intensidade variável entre as gestantes, retardaram a procura pelo alimento. Diante da possibilidade da técnica de gavagem e o álcool administrado contribuírem para a anorexia, por causar irritabilidade da mucosa gástrica, realizamos autópsias em gestantes que morreram espontaneamente durante a gestação. Em todos os casos estudados não havia sinais de agressão mecânica ou química das mucosas. Essa observação levou-nos a acreditar que a irritabilidade pela intolerância ao álcool e o estado de embriaguez são fatores que interferem, de forma também importante, na nutrição materna, pelo menos experimentalmente. Em estudos clínicos, no entanto, não se observa intolerância já que a ingestão, nesse caso, é voluntária.

Nos períodos P25 (final da amamentação) e P40 (pós-natal tardio) também foi observado diminuição no peso dos animais tratados em relação ao controle (N).

Em relação a P25 nossos resultados divergem dos de Abel (1995) que encontrou diminuição do peso ao nascer e nenhuma diferença no dia do desmame em animais expostos à mesma dose. Essa diferença, no entanto, pode ser justificada pelo menor período de exposição materna ao etanol no protocolo utilizado pelo autor, apenas do 8^o ao 20^o dia de gestação. Outra possível justificativa seria a proposta por Silva e colaboradores (2000), que afirmam que mães e/ou filhotes podem aumentar de peso a partir da abstinência. Segundo os autores, a maior necessidade calórica, pela ausência das calorias fornecidas pelo álcool, induziria um aumento na ingestão de alimentos e modificação na qualidade e quantidade do leite materno. No nosso trabalho, percebemos que os filhotes sob os efeitos indiretos do tratamento com álcool e da desnutrição apresentavam hiperatividade e déficit de atenção. Essas condições comportamentais "anormais", observadas no alcoolismo fetal (Streissguth et al., 1980; Driscoll, 1990; Rosenberg, 1996) e na desnutrição (Wainwright, 2001), poderiam justificar nossos resultados, já que em P25 os animais ainda se encontravam sob o efeito do tratamento com álcool e da desnutrição.

Ainda em relação aos períodos P25 e P40, chamou-nos a atenção o fato dos pesos dos animais nutridos do grupo aguardente e etanol diferirem estatisticamente. Nós não identificamos na literatura pertinente referência a trabalhos experimentais relacionados ao alcoolismo fetal comparando, conjuntamente, os efeitos tóxicos do etanol com os de uma bebida alcoólica comercial. No entanto, acreditamos que o que levou os animais do grupo aguardente a apresentarem pesos mais baixos que os do grupo etanol pode ter sido a constituição química da aguardente. Como suporte a essa hipótese, sugerimos que sendo a aguardente composta por diversos tipos de álcoois e, principalmente por ser adocicada artificialmente (Anexo), daria um suporte calórico maior aos ratos lactantes, ao contrário do etanol que fornece calorias vazias, fazendo com que a procura pelo leite materno fosse menos freqüente.

Entre os desnutridos, no entanto, esse resultado não foi observado, sendo o peso do grupo etanol significativamente mais baixo que o do grupo aguardente.

Possivelmente os efeitos da desnutrição associados à toxicidade e a baixa caloria do etanol tiveram maior influência sobre o peso corporal que a interação desnutrição-aguardente, durante a amamentação (P25). Nesse sentido, a desnutrição "in útero" determinada pelo reduzido aporte de nutrientes seria agravada pela ação indireta do álcool que reduz a capacidade de mamar e de metabolizar nutrientes associada à hiperatividade e ao déficit de atenção.

Segundo Silva e colaboradores (2000), no período de abstinência mães e filhotes apresentam maior necessidade calórica, devido à supressão das calorias derivadas do álcool; essa exigência induz um aumento na procura e na ingestão de alimentos. Essa afirmativa é corroborada por nossos resultados referentes ao pós-natal tardio (P40) quando os pesos dos grupos desnutridos e tratados, com exceção do grupo ED, não mais apresentaram diferença após 15 dias de abstinência (entre P25 e P40).

Nossos resultados em relação ao peso encefálico mostraram uma acentuada influência da desnutrição sobre este parâmetro, uma vez que apenas os animais dos grupos tratados desnutridos e do grupo desnutrido foram diferentes do controle. Vários protocolos experimentais apontam a influência do álcool sobre o peso encefálico, porém as diferentes metodologias utilizadas pelos diversos autores, dificultam a análise comparativa com nossos resultados. A microcefalia, no alcoolismo clínico (Rosenberg, 1996) ou experimental (Streissguth e colaboradores, 1980), é o principal fator apontado para justificar a redução da massa cerebral. Em trabalho semelhante ao nosso, Miller e Potempa (1990) referem a presença de microcefalia em animais com noventa dias de idade. Segundo os autores, a microcefalia seria decorrente da redução da quantidade e do volume dos neurônios e dos componentes da neuropila que diminuiriam a massa do córtex cerebral pesado isoladamente. No nosso trabalho consideramos o peso encefálico total, excluindo-se o bulbo olfatório e o cerebelo, essa diferença metodológica ao nosso ver poderia explicar a divergência entre os nossos resultados e os dos autores citados, em relação aos animais tratados e nutridos. Entretanto parece-nos ocorrer concordância em relação aos tratados desnutridos. Nesses casos, nossos resultados mostraram significativa redução do peso em relação ao controle, apontando a importância da desnutrição como co-fator que influencia o desenvolvimento embrionário cerebral. Esse aspecto ficou

bem evidenciado pela observação de que o peso encefálico do grupo etanol desnutrido (ED) é significativamente menor que o do grupo desnutrido (D). Atribuímos ainda, à suplementação calórica da aguardente o fato de não existir diferença de peso significativa entre os grupos aguardente desnutrido (AD) e desnutrido (D).

5.2 Efeitos do tratamento com álcool e da condição nutricional sobre o padrão morfológico do córtex cerebral

Conforme mencionado anteriormente (3.2.6. Análise estatística) para o estudo dos dados morfométricos utilizou-se a ANOVA bi-lateral (two-way), para medidas repetidas, em razão da complexidade dos dados a serem analisados.

Esse tratamento estatístico foi empregado porque permitiu avaliar a influência dos **efeitos principais** (Tratamento – água, aguardente ou etanol, condição nutricional e o tipo de região cortical), isoladamente, ou a **interação** desses efeitos sobre alguns parâmetros morfológicos das células NADPH-d+ e a densidade da neurógia. Dessa forma, a discussão dos nossos resultados baseou-se nos dados que puderam ser obtidos por esse método.

Os neurônios, os astrócitos e a microglia são particularmente importantes no que se refere à liberação de grandes quantidades de óxido nítrico (NO), gás difusível com variadas funções farmacológicas cerebrais. O NO durante o desenvolvimento do SNC atua mediando a diferenciação celular (Ogura et al., 1996) e regula os processos de sobrevivência e morte celular (Ikonomidou et al., 2001).

Em razão da importância dos neurônios produtores de NO (células NADPH-d positivas), enfocamos no nosso trabalho essas células, utilizando-as como célula-alvo para avaliar os possíveis efeitos do alcoolismo materno, associado ou não a desnutrição, durante o desenvolvimento cerebral perinatal. Assim avaliou-se a influência desses fatores sobre o número, a área do soma e a densidade desses neurônios em duas regiões corticais distintas.

Todos os animais estudados em nosso protocolo sofreram os efeitos do álcool (do 1^o dia de gestação ao 25^o dia de vida) e/ou da desnutrição (1^o dia de gestação ao 40^o dia de vida) durante o período da organogênese do córtex

cerebral (aproximadamente entre o 9^o e 19^o dias de gestação) e de grande parte do período em que ocorrem os eventos celulares proliferativos (entre o 9^o dia de gestação e o 35^o do pós-natal precoce) (Morgane et al., 1993). Dessa forma entendemos que as medidas morfométricas por nós avaliadas refletem um estágio posterior ao período crítico de desenvolvimento do córtex cerebral e período final dos processos proliferativos neurogliais (microneurogênese, gliogênese tardia e mielinização), já que os animais estudados eram jovens (40 dias de vida).

A análise estatística (**Tabela 1**) revelou que a condição nutricional dos grupos (nutrido ou desnutrido), isoladamente, influenciou todos os parâmetros relacionados com os neurônios NADPH-d+, mas não a densidade neuroglial. Ao contrário, o tratamento com álcool (aguardente ou etanol) interferiu apenas nas densidades dos neurônios NADPH-d+ e neuroglial. Quanto ao tipo de região cortical encontrou-se diferença apenas na densidade neuroglial do córtex posterior.

Picanço-Diniz e colaboradores (1998) e Borba e colaboradores (2000) estudaram os padrões morfológicos das células NADPH-d+ no córtex visual de ratos desnutridos (DBR ou similar) e com recuperação nutricional (primeira referencia). Os resultados encontrados foram iguais em relação à densidade celular, que eram maiores em relação ao controle, e diferentes quanto a área do soma. Borba e colaboradores (2000) encontraram em animais mais jovens (30 a 40 dias de vida) uma redução significativa da área celular, enquanto que nos ratos já adultos (135 a 212 dias) estudados por Picanço-Diniz e colaboradores (1998) não havia diferença, em relação ao controles. Por outro lado, Miller e Potempa, (1990) observaram que, no córtex somatosensorial de ratos com 90 dias de idade, tratados com 6,7% de etanol e suplementação isocalórica no período pré-natal, não havia diferença na densidade das células gliais e neuronais totais, quando comparada a dos controles. Ainda, o número e a área dos neurônios totais eram significativamente menores nos animais expostos ao etanol, porém a área do soma glial era maior.

Quanto à densidade celular das células NADPH-d+ nossos resultados são concordantes com aqueles obtidos por Picanço-Diniz e colaboradores (1998) e Borba e colaboradores (2000) e justificados pela miniaturização

(empacotamento) do cérebro determinado pela redução dos componentes celulares e da neurópila, que aproximando as células remanescentes dão a falsa imagem de maior número. A diminuição do volume e a organização anormal do córtex cerebral resultam na microcefalia observada no alcoolismo e na desnutrição fetal. Segundo Rosenberg (1996) a microcefalia observada em crianças que desenvolvem a Síndrome do Alcoolismo Fetal (FAS) é decorrente da interferência do álcool na biossíntese dos gangliosídeos que governam os mecanismos de desenvolvimento neuronal. A exposição a níveis moderados de álcool bloqueia importantes etapas dessa síntese determinando o desenvolvimento aberrante do cérebro e conseqüentemente a microcefalia.

A aparente divergência dos nossos resultados com os de Miller e Potempa, (1990) poderia ser explicada pela diferença metodológica já que as medidas de densidade celular feitas por esses autores dizem respeito aos neurônios totais. Como os neurônios NADPH-d+, por nós estudados, constituem apenas 1 a 2% da população neuronal o seu aumento possivelmente não interfere na densidade total.

As medidas de área e de volume celular representam um dos desafios para o estudo da morfometria tecidual já que esses parâmetros são influenciados pelo "instante dinâmico" pelo qual o tecido está passando no momento de sua obtenção. Picanço-Diniz e colaboradores (1998) e Borba e colaboradores (2000), conforme assinalado anteriormente, obtiveram resultados diferentes em relação à área do soma dos neurônios NADPH-d+. Nossos resultados são ainda mais divergentes já que nossas medidas indicam aumento do corpo celular. Esses autores sugeriram que os neurônios da substância cinzenta cortical podem modificar sua área conforme o estímulo recebido num determinado momento, podendo posteriormente voltar a sua condição de "normalidade", significando que a variação da área celular constitui uma modificação transitória. De fato, diante de estímulos, fisiológicos ou não, um tecido pode apresentar diferentes comportamentos que se refletem no número de suas células, ou na área e volume destas. Considerando que essas são condições adaptativas supõe-se que a medida celular é diretamente correlacionada ao momento metabólico da célula (Rubin, 1998).

O estudo estatístico do nosso trabalho revelou que a condição nutricional é o único efeito principal que interfere sobre o número e a área do corpo celular

neuronal. No entanto, recentemente Heaton e colaboradores (2003), trabalhando com ratos recém-nascidos com exposição aguda ao etanol sugeriram que durante curtos períodos do desenvolvimento tardio o SNC parece ser relativamente resistente aos danos mediados pelo etanol. Segundo os autores, diferenças nos níveis basais de expressão de moléculas reguladoras de sobrevivência e morte celular, estimulados pelo álcool, poderiam favorecer a neurotoxicidade induzida pelo etanol em períodos críticos do desenvolvimento cerebral precoce. Posteriormente, nos períodos tardios desencadeariam mecanismos de resistência ou de compensação (plasticidade neural) à agressão pelo álcool. Dessa forma, neurônios sensíveis a essas moléculas reguladoras poderiam não só elevar o metabolismo e consequentemente aumentar a área somática, como também reiniciar um ciclo miótico reativando a microneurogenese e a gliogenese tardia. Esse último evento poderia explicar o aumento da densidade neuroglial e do número de células NADPH-d+, observado neste trabalho, desencadeado pela continuidade da desnutrição e pela ação do álcool, ou pela abstinência deste, no período etário estudado (P40). Por esse motivo, é possível que a interação álcool-desnutrição tenha tido maior influência sobre a densidade neuroglial do córtex posterior.

Uma vez que o estudo da densidade neuroglial envolve elementos celulares diferentes e de capacidade adaptativa variada, somente através de estudo diferenciado (marcações específicas) seja possível distinguir as respostas das células a estímulos interativos, como ocorre com o álcool e a desnutrição.

Em resumo, nossos resultados revelam uma interferência do álcool (aguardente *in natura* ou etanol) e da desnutrição, de forma isolada ou em associação, no desenvolvimento perinatal reduzindo o peso corporal e encefálico de ratos jovens. Essa ação se reflete também no padrão citomorfológico do córtex cerebral e em especial no que se refere às células NADPH-d+ e a densidade neuroglial na idade estudada.

Assim, embora nosso trabalho seja experimental e tenha sido desenvolvido sobre um tema onde diferentes metodologias são aplicadas, porém com similaridade à condição humana, parece-nos oportuno alertar para a necessidade de averiguar na prática clínica materno-infantil o alcoolismo materno e suas

repercussões na criança. São preocupantes os dados estatísticos sobre a incidência mundial da Síndrome do Alcoolismo Fetal (Abel e Sockol, 1991), assim como as dificuldades encontradas para o seu diagnóstico (Bookstein e colaboradores, 2002).

6. Conclusões

Nosso experimento permite concluir que:

1. O álcool (aguardente *in natura* ou etanol) e a desnutrição interferem, de forma isolada ou em associação, no desenvolvimento perinatal de ratos jovens reduzindo o peso corporal e encefálico;
2. Ocorre modificação do padrão citomorfológico do córtex cerebral em ratos wistar aos 40 dias de vida, observando-se que:
 - a) a desnutrição aumenta o número, a área do soma e a densidade de neurônios NADPH-d positivos;
 - b) o tratamento com álcool causa aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial;
 - c) A densidade neuroglial é maior no córtex posterior;
 - d) A interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com álcool induz aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial;
 - e) A interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com álcool induz aumento da área do soma de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial no córtex posterior.

7. Perspectivas

O alcoolismo em razão da sua repercussão médica, social e econômica é um tema sempre atual e desafiador.

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu o surgimento de várias idéias de experimentos científicos que possam de alguma forma contribuir o para desvendar os mecanismos fisiopatológicos do alcoolismo. Tais como:

1. Comparar os padrões morfológicos das árvores dendríticas neuronais no material presentemente estudado;
2. Desenvolvimento de um método de análise morfométrica para diferenciação e quantificação da população neuroglial no material estudado;
3. Investigar as formas de resposta das células neurogliais nos diferentes estágios de desenvolvimento do SNC;
4. Avaliar os índices mitótico e apoptótico neuroglial durante o desenvolvimento fisiológico do SNC ou sob a influência do álcool;
5. Comparar os efeitos de diferentes bebidas alcoólicas comercializadas "in natura" sobre o desenvolvimento do SNC.

ABSTRACT

Wistar male rats were generated and suckled by dams submitted to either a commercial laboratory diet ("Labina", Purina do Brasil Ltda, with 23% protein; group N) or to a low-protein diet ("Basic Regional Diet", BRD, with 8% protein; group M). Each nutritional group was subdivided in 3, according to their mother's treatment during gestation and lactation, by gavage, either with filtered water, or "aguardente" (A), or ethanol (3g/kg/d; E). In the resulting 6 groups of pups, the body weights (at postnatal days P3, P25 and P40) and brain weights (at P40), as well as the citomorphological pattern of cortical neurones containing NADPH-diaphorase (NADPH-d; at P40) were studied. At P3, body weights of groups A and E were lower than the control (group N). At P25 and P40, the following body weight differences ($P < 0,05$) were found: group $A < N$ and $A < E$; $EM < M$; $A < AM$ and $EM < E$. Group EM had lower body weights than group AM only at P25. The malnourished groups had always lower body weights than the N-ones, as expected. Concerning brain weights, group M, AM and EM had lower values than the respective well-nourished groups (N, AN and EN). Group EM had lower brain weights than group M. Serial histological brain slices were processed for NADPH-d histochemistry and adjacent slices were stained by Nissl's method. Computer programs for image capture and analysis were used in the morphometric measurements (NADPH-d cell number-, density and cell body area, as well as neuroglial density in the Nissl-stained slices). In all cases, values of the 3 M-groups were greater than those of the N-group. The "nutrition" factor alone influenced all metric parameters, except neuroglial cell density. The treatment with "aguardente" or ethanol influenced only the density-related measurements. Neuroglial densities were found to be higher at the posterior cortex, as compared to the frontal one. It is concluded that: 1) the alcoholic treatments (both, "aguardente" in natura and ethanol), as well as malnutrition, isolated or in association, interfere in the perinatal development of young rats, reducing body- and brain weights; 2) the citomorphological pattern changes of NADPH-d cells induced by malnutrition and/or by the alcoholic treatments suggest a proliferative stimulation of cortical NADPH-d neurones and neuroglial cells. 3) Although the chemical composition of "aguardente" is more complex than that of ethanol, the difference between their effects on the studied parameters seems to be minimal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E.L.; SOKOL, R.J. A revised conservative estimative of the incidence of FAS and its economic-impact. *Alcoholism – Clinical and Experimental Research* 15, pp. 514-524, 1991.

ABEL, E.L. An update on incidence of FAS: FAS is not an equal opportunity birth defect. *Neurotoxicol. Teratol.*, 17, pp. 437 - 443, 1995.

ABEL, E.L.; HANNINGAN, J.N. Risk factors pathogenesis. In: Spohr, H. L. and Steinhausen, H. A. *Alcohol, Pregnancy, and Developing child*, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 63 -75, 1996.

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

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

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (9), pp. 1053 - 1061, 1999.

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

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.

BOOKSTEIN, F.L.; STREISSGUTH, A.P.; SAMPSON, P.D.; CONNOR, P.D.; BARR, H.M. Corpus callosum shape and neuropsychological deficits in adult males with heavy fetal alcohol exposure. *NeuroImage* 15, pp. 233-251, 2002.

BORBA, J.M.C.; ARAÚJO, M.S.; PICANÇO-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* 53, pp. 193-201, 2000.

BRODY, T. Alcohol, IN: *Nutritional biochemistry* 9^a Ed. Cap. 4, pp. 201-220, Academic Press (London), 1998.

CHEPKOVA, A.N.; N.V. DOREULLE; S.S. TROFIMOV; T. A. GUDASHEVA; R.U. OSTROVSKAYA; V.G. SKREBITSKY Nootropic compound L-pyroglutamyl-D-alanine-amide restores hippocampal potentiation by exposure to ethanol in rats. *Neurosci. Lett.* 188, pp. 163 - 166, 1995.

CHURCH, M.W.; JEN, C.; PELLIZZON, M.A.; HOLMES, P. Prenatal cocaine, Alcohol, and undernutrition differentially alter minerals and protein content in fetal rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59, pp. 577-584, 1998.

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.* 121, pp.789 - 796, 1992.

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

DELUCA, B.; CIOFFI, L. A.; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. *Activitas Nervosa Superior* 19, pp. 130-131, 1977.

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

DICKINSON, R.; FRANKS, N.P.; LIEB, W.R. Thermodynamics of anesthetic/protein interaction. Temperature studies on firefly luciferase. *Biophys. J.* 64, pp. 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, pp. 383-387, 1989.

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

DRISCOLL, C.D.; STREISSGUTH, A.P.; RILEY, E..P. Prenatal alcohol exposure: comparability of effects on humans and animal models. *Neurotoxicol. Teratol.* 12, pp. 231 - 238, 1990.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide neurotoxicity. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 10, pp. 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, pp. 219-227, 1996.

ECKARDT, M.; MARTIN, P.R. Clinical assessment of cognition in alcoholism. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10, pp. 123 - 127, 1986.

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

FISHER, S. E. Selective fetal malnutrition: The fetal alcohol syndrome. *J. Am. Coll. Nutr.* 7: pp. 101-106, 1988.

FITZGERALD, L.W.; CHARLTON, M.E.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. Regulation of neuronal nitric oxide synthase by chronic ethanol ingestion. *Synapse* 21, pp. 93-95, 1995.

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* 37, pp. 591-602, 2002.

FRANCA, J.G.; VOLCHAN, E.; JAIN, N.; CATANIA, K.C.; OLIVEIRA, R.L.S.; HESS, F.F.; JABLONKA, M.; ROCHA-MIRANDA, C.E.; KAAS, J.H. Distribution of NADPH-diaphorase cells in visual and somatosensory cortex in four mammalian species. *Brain Research* 864, pp.163-175, 2000.

FREUND, G. Chronic central nervous system toxicity of alcohol. *Ann. Rev. Pharmac.* 13, pp. 217 - 227, 1973.

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

GUEDES, R.C.A. O Cérebro desnutrido. *Ciência Hoje*. 3, pp. 61-65, 1985.

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

GUERRI, C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22, pp. 304 - 312, 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 systems from rat cerebral cortex and striatum. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 113C, No. 3, pp. 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*. 44, pp. 1399-1413, 1996.

GOODLETT, C. R.; LILLER, M. W.; HOFFMAN, P. Mechanisms of ethanol induced neuronal death during development: from molecular to behavior. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20, No. 8, pp. 128A - 132A, 1996.

HANNIGAN, J.H. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55 (4), pp. 489 - 499, 1996.

HEATON, M.B.; PAIVA, A.; MADORSKY, I.; MAYER, J.; MOORE, D.B. 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, pp. 237-252, 2003.

HSIEH, R.P.N.; WILKE, N.; HARRIS, A.; MILLES, F. Interaction of ethanol with inducers of glucose-regulated stress proteins: ethanol potentiates inducers of 78 transcription. *J. Biol. Chem.* 271, pp. 2709 - 2716, 1996.

HUNT, W.A. Neurotransmitter function in the basal ganglia after chronic ethanol treatment. *Fed. Proc.* 40, pp. 2077 - 2081, 1981.

IKONOMIDOU, 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, pp. 401-405, 2001.

JONES, K.L.; SMITH, D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 2, PP. 999-1001, 1973.

JONES, K.L.; CHAMBERS, C.C.; JOHNSON, K.A. The effect of disulfiram on the unborn baby. *Teratology* 43, pp. 438, 1991.

KELLY, S.J.; MAHONEY, J.C.; WEST, J.R. Changes in brain microvasculature resulting from early postnatal alcohol exposure. *Alcohol* 7, pp. 43 - 47, 1990.

KENROTTI, S.; RAHMAN, H.; GROVE, J.; VERNADAKIS, A. Ethanol neurotoxicity in the embryonic chick brain in vivo and in culture: interaction of the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, pp. 859 - 870, 1995.

KIMURA, H.; MIURA, S.; HIGUCHI, H.; KUROSE, I.; TSUZUKI, Y.; SHIGEMATSU, T.; EBINUMA, H.; KATO, S.; ISHII, H. Effect of chronic ethanol feeding on nitric oxide synthesis by rat Kupffer cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20 (Suppl. 1), pp. 69A-72A, 1996.

KOREN, G.; NULMAN, I. Teratogenic drugs and chemicals in humans. In Koren G. Ed. *Maternal - Fetal Toxicology*. Marcel Dekker, New York, pp. 33-48. 1994.

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

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.* 770, pp. 139 -150, 1997.

LUO, J.; MILLER, M.W. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Res. Ver.* 27, pp. 157 - 167, 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* 11, pp. 147 - 156, 1994.

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

MAYHAN, W.G.; DIDION, S.P. Effect of chronic alcohol consumption on responses of cerebral arterioles. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, vol 20, No. 3, pp. 538 - 542, 1996.

MICHAELIS, E.K.; W.J. FREED; N. GALTON; J.F. FOYE; M.L. MICHAELIS; I. PHILLIPS; J.E. KLEINMAN Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem. Res.* 15, pp. 1055 - 1063, 1990.

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

MILLER, M. W. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to alcohol. *Alc. Clin. Exper. Res.* 17, pp. 304 - 314, 1993.

MILLES, M.F.; J.E. DIAZ, DEGUZMAN, V. Ethanol-responsive gene expression in neural cell cultures. *Biochem. Biophys. Acta* 1138, pp. 268 - 274, 1992.

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 Biohevioral Reviews.* 17, 91-128, 1993.

MUKHERJEE, A.B.; HODGEN, G.D. Maternal ethanol exposure induced transient impairment of umbilical circulation and fetal hypoxia in monkeys. *Science*, 218, pp. 700 - 701, 1982.

NATIONAL CENTRE FOR HEALTH STATISTICS Advanced report on final natality statistics, 1988. *Monthly Vital Statistics report*, vol. 39, No. 4, Supplement, DHHS Publication No. (PHS) 90 - 1120, Hyattsville, MD: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1990.

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

NIXON, K.; CREWS, F.T. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus *Journal of Neurochemistry*, 83, pp.1087-1093, 2002.

NULMAN, I.; GLADSTONE, J.; O'HAYON B.; KOREN, G. The effects of alcohol on the fetal brain. In: *Handbook Of Developmental Neurotoxicology* , (Eds) W. SLIKKER & L.W. CHANG, Academic Press, N.Y., 1998.

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

ÖZER, E.; SARIOGLU, S.; GÜRE, A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin. Neuropath.* 19, No. 1, pp. 21 - 25, 2000.

PAAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central Nervous System. *Annals of Medicine – University of Helsinki*. 27:pp. 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 Tese de Mestrado, 112 p. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Departamento de Nutrição-CCS, Univer. Fed. de Pernambuco, 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* 55, pp. 113 - 120, 1994.

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

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* 14, pp. 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, pp. 35-48, 1998.

REYNOLDS, T.B.; REDEKER, A.G.; KUZMA, O.T. Role of alcohol in pathogenesis of alcoholic cirrhosis. In: McITYRE, N.; SHERLOCK, S. (Eds) *Therapeutic agents and the liver*, Philadelphia: F.A. Davis Co., pp. 131 - 132, 1965.

ROCHA-DE- MELO, A.P. Modificação do estado nutricional no rato recém-nascido, por manipulação da ninhada: Estudo morfo-funcional do sistema nervoso. Tese de Doutorado, 68 p., Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Departamento de Nutrição-CCS, Univer. Fed. de Pernambuco, 2001.

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

RUBIN, E.; FARBER, J. Cell injury. IN: RUBIN, E.; FARBER, J. (Eds.) *Pathology*. Lippincott-Press Publishers - PA, pp. 1-34, 1998.

SANTOS-MONTEIRO, J. Nutrição, Privação Sensorial Específica e Plasticidade Cerebral. Tese de Doutorado, 61 p., Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Departamento de Nutrição-CCS, Univer. Fed. de Pernambuco, 2002.

SCOTT, HC.; PAUL W.K.; RUDEEN, P.K. Effects of in utero ethanol exposure on the developmental of LHRH neurons in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 66, pp. 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* 34, pp. 125-140, 1999.

SILVA, V.A.; SILVA, J.B.; GISMONDI, R.A.O.C.; REBELLO, G.P. Ethanol improves lactation outcome in malnourished rats. *Nutritional Neuroscience* 3, pp. 277-282, 2000.

SPARROW, J.R. Inducible nitric oxide synthase in the Central Nervous System. *Journal of Molecular Neuroscience*. 5, pp. 219-229, 1995.

STREISSGUTH, A.P.; LANDESMAN-DWYER, S.L. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 209, pp. 353-361, 1980.

STREISSGUTH, A.P.; BOOKSTEIN, F.L.; BARR, H.M. A dose-response study of the enduring effects of prenatal alcohol exposure: birth to 14 years. In: H. SPOHN And H. STEINHÄUSEN, Eds. *Alcohol, Pregnancy and Developing Child*, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 141 - 168, 1996.

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

TAVARES DO CARMO, M.G.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M.; MARTÍN-HIDALGO, A.; HERRERA, E. Effects of ethanol intake on lipid metabolism in the lactating rat. *Alcohol* 13, pp. 443-448, 1996.

TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A.M.; GUEDES, R.C.A. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* XL, pp. 533-545, 1990.

WAINWRIGHT, P.E. The role of nutritional factors in behavior development in laboratory mice. *Behavioral Brain Research*. 125, pp.75-80, 2001.

WALKER, D.W.; BARES, D.E.; RILEY, J.N.; HUNTER, B.E.; ZORNETZER, S.F. The neurotoxicity of chronic alcohol consumption, an animal model. In: *Psychopharmacology of Ethanol*, pp. 17 - 31. Ed. M. Sandler. Raven Press. New York, 1980a.

WEST, J.R.; WEI-JUNG, A.; CHEN, PANTAZIS, N.J. Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab. Brain. Dis.* 9, pp. 291 - 322, 1994.

WINICK, M; ROSSO, P.; BRASEL, J.A. Malnutrition and cellular growth in the brain: Existence of critical periods. In: *Lipids, malnutrition and the developing brain*. CIBA Foundation Symposium. Amsterdam; Elsevier, pp. 199-212, 1972.

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, pp. 434-456, 1998.

WOZNIAK, K.M.; PERT, A.; MELE, A.; LINNOILA, M. Focal application of alcohol elevates extracellular dopamine in rats brain: a microdialysis study. *Brain Res.* 540, pp. 31 - 40, 1991.

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

ZOELLER, R.T.; BUTNARIU, O.V.; FLETCHER, D.L.; RILEY, E.P. Limited postnatal ethanol exposure permanently alters the expression of m-RNAS encoding myelin basic protein and myelin-associated glycoprotein in cerebellum. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18, pp. 909 - 916, 1994.

Anexo 6 - Evolução ponderal nos 3º (P3), 25º (P25) e 40º (P40) dias de vida de ratos machos Wistar, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos - N e D), aguardente (grupos - A e AD) e etanol (3g/kg - grupos E e ED). Os dados representam o peso médio $\pm$ desvio padrão. O número de animais é dado entre os parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores correspondentes nos grupos marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. Foi utilizada a ANOVA "one-way" para avaliar as diferenças entre os grupos, seguida do teste de Spjotvoll e Stoline para as comparações múltiplas.

EVOLUÇÃO PONDERAL (g)				
GRUPOS		P3	P25	P40
NUTRIDO (N)	(a)	10,2 $\pm$ 2,64 (14)	68,0 $\pm$ 7,88 (14)	154,0 $\pm$ 15,85 (14)
AGUARDENTE (A)	(b)	7,2 $\pm$ 0,52 ^a (10)	48,2 $\pm$ 11,57 ^a (10)	127,9 $\pm$ 20,07 ^{ac} (10)
ETANOL (E)	(c)	8,5 $\pm$ 0,90 ^a (15)	66,8 $\pm$ 5,2 (15)	154,3 $\pm$ 14,7 (15)
DESNUTRIDO (D)	(d)	7,8 $\pm$ 1,29 ^a (14)	33,6 $\pm$ 4,2 ^a (14)	57,03 $\pm$ 24,35 ^a (14)
AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD)	(e)	7,1 $\pm$ 1,12 (16)	29,3 $\pm$ 6,59 ^b (16)	51,48 $\pm$ 15,0 ^b (16)
ETANOL DESNUTRIDO (ED)	(f)	7,2 $\pm$ 1,02 (15)	18,9 $\pm$ 3,88 ^{c,d,e} (15)	35,7 $\pm$ 7,73 ^{c,d} (15)

Anexo 7 - Peso encefálico aos 40 dias de vida (**P40**) de ratos machos Wistar, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos - **N** e **D**), aguardente (grupos - **A** e **AD**) ou etanol (3g/kg - grupos **E** e **ED**). Os dados representam o peso médio $\pm$ desvio padrão. O número de animais é dado entre os parênteses. As letras minúsculas indicam valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) dos valores correspondentes nos grupos marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. Foi utilizada a ANOVA "one-way" para avaliar as diferenças entre os grupos, seguida do teste de Spjotvoll e Stoline para as comparações múltiplas.

PESO ENCEFÁLICO AOS 40 DIAS DE VIDA (P40)	
GRUPOS	PESO (g)
NUTRIDO (N)	$1,130 \pm 0,03$
(a)	(14)
AGUARDENTE (A)	$1,037 \pm 0,07$
(b)	(10)
ETANOL (E)	$1,058 \pm 0,12$
(c)	(15)
DESNUTRIDO (D)	$0,963 \pm 0,09^a$
(d)	(12)
AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD)	$0,888 \pm 0,11^b$
(e)	(16)
ETANOL DESNUTRIDO (ED)	$0,815 \pm 0,08^{c,d}$
(f)	(15)

Anexo 8 - Número de neurônios NADPHd+ em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos - **N** e **D**), aguardente (grupos - **A** e **AD**) ou etanol (3g/kg - grupos **E** e **ED**). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. O número de animais é dado entre os parênteses.

NÚMERO DE NEURÔNIOS NADPH-d+		
GRUPOS	CÓRTEX POST.	CÓRTEX FRONTAL
NUTRIDO (N)	428 $\pm$ 29,0 (8)	438 $\pm$ 24,0 (8)
AGUARDENTE (A)	461 $\pm$ 17,1 (6)	437 $\pm$ 22,6 (6)
ETANOL (E)	408 $\pm$ 17,5 (6)	438 $\pm$ 6,3 (6)
DESNUTRIDO (D)	466 $\pm$ 25,9 (7)	467 $\pm$ 36,3 (7)
AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD)	500 $\pm$ 79,1 (5)	484 $\pm$ 59,0 (5)
ETANOL DESNUTRIDO (ED)	514 $\pm$ 48,8 (7)	491 $\pm$ 49,5 (7)

Anexo 8a - Sumário da ANOVA "two way" para análise estatística da influência dos efeitos principais e das interações sobre o **número de neurônios NADPH-d+** em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia com água, aguardente ou etanol (3g/kg).

EFEITO	p<0,05
PRINCIPAL	
1. Condição nutricional	0,000214*
2. Tratamento	0,282381
3. Tipo de córtex	0,433052
INTERAÇÃO	
Condição nutricional x Tratamento	0,209375
Condição nutricional x Tipo de córtex	0,082678
Tratamento x Tipo de córtex	0,236372
Condição nutricional x Tratamento x Tipo de córtex	0,143708

Anexo 9 – Área do soma de neurônios NADPHd+ em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos – **N** e **D**), aguardente (grupos – **A** e **AD**) ou etanol (3g/kg - grupos **E** e **ED**). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. O número de animais é dado entre os parênteses.

ÁREA DO SOMA DOS NEURÔNIOS NADPH-d+ (μm^2)		
GRUPOS	CÓRTEX POST.	CÓRTEX FRONTAL
NUTRIDO (N)	222 $\pm$ 5,4 (5)	215 $\pm$ 7,1 (5)
AGUARDENTE (A)	200 $\pm$ 5,2 (5)	224 $\pm$ 10,2 (5)
ETANOL (E)	215 $\pm$ 11,4 (5)	211 $\pm$ 13,2 (5)
DESNUTRIDO (D)	235 $\pm$ 15,2 (5)	233 $\pm$ 11,6 (5)
AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD)	237 $\pm$ 12,2 (5)	239 $\pm$ 12,5 (5)
ETANOL DESNUTRIDO (ED)	246 $\pm$ 14,6 (5)	249 $\pm$ 11,2 (5)

Anexo 9a - Sumário da ANOVA "two way" para análise estatística da influência dos efeitos principais e das interações sobre a **área do soma de neurônios NADPHd+ (μm^2)** em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia com água, aguardente ou etanol (3g/kg).

EFEITO	P<0.05
PRINCIPAL	
1. Condição nutricional	0,000000*
2. Tratamento	0,437019
3. Tipo de córtex	0,233407
INTERAÇÃO	
Condição nutricional x Tratamento	0,110658
Condição nutricional x Tipo de córtex	0,445785
Tratamento x Tipo de córtex	0,009723*
Condição nutricional x Tratamento x Tipo de córtex	0,025346

Anexo 10 – Densidade de neurônios NADPHd+ em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos – **N** e **D**), aguardente (grupos – **A** e **AD**) ou etanol (3g/kg - grupos **E** e **ED**). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. O número de animais é dado entre os parênteses.

DENSIDADE DE NEURÔNIOS NADPH-d + (12.234μm²)		
GRUPOS	CÓRTEX POST.	CÓRTEX FRONTAL
NUTRIDO (N)	7,38 $\pm$ 0,92 (5)	7,27 $\pm$ 1,37 (5)
AGUARDENTE NUTRIDO(A)	8,33 $\pm$ 2,28 (5)	9,12 $\pm$ 2,42 (5)
ETANOL NUTRIDO (E)	7,49 $\pm$ 1,10 (5)	7,6 $\pm$ 1,48 (5)
DESNUTRIDO (D)	8,4 $\pm$ 1,58 (5)	9,1 $\pm$ 1,27 (5)
AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD)	8,9 $\pm$ 1,45 (5)	8,3 $\pm$ 1,38 (5)
ETANOL DESNUTRIDO (ED)	10,6 $\pm$ 1,56 (5)	10,6 $\pm$ 1,66 (5)

Anexo 10a - Sumário da ANOVA “two way” para análise estatística da influência dos efeitos principais e das interações sobre a **densidade de neurônios NADPHd+ (μ m²)** em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia com água, aguardente ou etanol (3g/kg).

EFEITO	p<0.05
PRINCIPAL	
1. Condição nutricional	0,000000*
2. Tratamento	0,006327*
3. Tipo de córtex	0,512927
INTERAÇÃO	
Condição nutricional x Tratamento	0,000006*
Condição nutricional x Tipo de córtex	0,724367
Tratamento x Tipo de córtex	0,830204
Condição nutricional x Tratamento x Tipo de córtex	0,138267

Anexo 11 – Densidade neuroglial em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia de água (grupos – **N** e **D**), aguardente (grupos – **A** e **AD**) ou etanol (3g/kg - grupos **E** e **ED**). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. O número de animais é dado entre os parênteses.

DENSIDADE NEUROGLIAL POR ÁREA (12.234μm^2)		
GRUPOS	CÓRTEX POST.	CÓRTEX FRONTAL
NUTRIDO (N)	793 $\pm$ 82,8 (5)	734 $\pm$ 93,0 (5)
AGUARDENTE NUTRIDO(A)	841 $\pm$ 86,5 (5)	847 $\pm$ 62,3 (5)
ETANOL NUTRIDO (E)	857 $\pm$ 57,4 (5)	827 $\pm$ 45,6 (5)
DESNUTRIDO (D)	885 $\pm$ 80,3 (5)	858 $\pm$ 96,9 (5)
AGUARDENTE DESNUTRIDO (AD)	743 $\pm$ 84,6 (5)	645 $\pm$ 70,4 (5)
ETANOL DESNUTRIDO (ED)	975 $\pm$ 55,4 (5)	927 $\pm$ 79,7 (5)

Anexo 11a - Sumário da ANOVA “two way” para análise estatística da influência dos efeitos principais e das interações sobre a **densidade neuroglial** (μm^2) em 4 cortes seriados do córtex posterior e 4 do córtex frontal de ratos machos Wistar com 40 dias de vida, procriados e amamentados por mães nutridas (Labina) ou desnutridas (DBR) tratadas, por gavagem, com 3,8 ml/dia com água, aguardente ou etanol (3g/kg).

EFEITO	P<0.05
PRINCIPAL	
1. Condição nutricional	0,113065
2. Tratamento	0,000000*
3. Tipo de córtex	0,000004*
INTERAÇÃO	
Condição nutricional x Tratamento	0,000000*
Condição nutricional x Tipo de córtex	0,095197
Tratamento x Tipo de córtex	0,940931
Condição nutricional x Tratamento x Tipo de córtex	0,006343*

RESUMO

Ratos Wistar foram gerados e amamentados por matrizes submetidas a dois tratamentos nutricionais: 1) dieta padrão do biotério ("Labina", Purina do Brasil Ltda, com 23% de proteína, grupo N) e 2) dieta hipoproteica ("Dieta Básica Regional" – DBR com 8% de proteína, grupo D). Cada grupo nutricional foi subdividido em 3, conforme o tratamento, por gavagem, com água, aguardente (A) ou etanol (E), originando os 06 grupos desse trabalho, onde foram estudados o desenvolvimento do peso corporal e encefálico e o padrão citomorfológico do córtex visual através de marcação histoquímica para NADPH-d e morfometria. O estudo da evolução ponderal avaliou três períodos: 3^o (P3), 25^o (P25) e 40^o (P40) dias de vida. Em P3 apenas os grupos nutridos (A e E) tinham peso significativamente menores, quando comparados com os nutridos (N). Em P25 e P40 os grupos A e ED apresentaram significativa redução de peso quando comparados com os grupos N e D, respectivamente. Os grupos nutridos (A e E), comparados entre si, apresentaram diferença de peso significativa em P25 e P40, sendo esses mais baixo no grupo A. Entre os desnutridos (AD e ED) houve diferença estatística apenas em P25, tendo o grupo ED menor peso. Percebeu-se diferença significativa de peso na comparação de grupos com mesmo tratamento e dietas diferentes (A x AD e E x ED) em P25 e P40, tendo os grupos AD e ED os menores pesos. A comparação entre os grupos N e D mostrou que nos 3 períodos o peso médio era significativamente mais baixo no grupo D. Em relação ao peso encefálico não houve diferença entre os grupos A e E e o controle N, mas houve entre ED e D. Comparados os grupos AD e ED tinham peso menor que os grupos A e E. O peso encefálico do grupo D era estatisticamente menor que o controle (N). Cortes histológicos coronais seriados do encéfalo, obtidos de animais perfundidos aos 40 dias de vida, foram marcados para NADPH-diaforase ou corados pelo Nissl. O estudo morfométrico feito nesse material avaliou o número, a área e a densidade de neurônios NADPH-d+, e a densidade neuroglial. A condição nutricional isoladamente influenciou todos os parâmetros com exceção da densidade neuroglial. Por outro lado, o tratamento com aguardente ou etanol interferiu apenas nas medidas relacionadas às densidades, enquanto que a densidade neuroglial foi aparentemente mais acentuada na área cortical posterior. Concluiu-se que: 1) O álcool (aguardente *in natura* ou etanol) e a desnutrição, de forma isolada ou em associação, interferem no desenvolvimento perinatal de ratos jovens reduzindo o peso corporal e encefálico; 2) Ocorre modificação do padrão citomorfológico do córtex cerebral em ratos Wistar, com 40 dias de vida, observando-se que: a) a desnutrição aumenta o número, a área do soma e a densidade de neurônios NADPH-d positivos; b) o tratamento com álcool causa aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial; c) a densidade neuroglial é maior no córtex posterior; d) a interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com álcool induz aumento da densidade de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial; e e) a interação dos efeitos da desnutrição e do tratamento com álcool induz aumento da área do soma de neurônios NADPH-d positivos e da densidade neuroglial no córtex posterior.