

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**MORFOMETRIA DO CEREBELO DE RATOS MACHOS UChA e UChB
SUBMETIDOS A SEPARAÇÃO MATERNA NEONATAL
(consumidores voluntários de etanol)**

SUELEN ALVES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa de PG
em Biologia Geral e Aplicada

BOTUCATU - SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**MORFOMETRIA DO CEREBELO DE RATOS MACHOS UChA e UChB
SUBMETIDOS A SEPARAÇÃO MATERNA NEONATAL
(consumidores voluntários de etanol)**

SUELEN ALVES DE OLIVEIRA

Prof Dr. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

(Orientador)

Prof. Dr. MARCELO MARTINEZ

(Co- Orientador)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no Programa de PG
em Biologia Geral e Aplicada

BOTUCATU - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Oliveira, Suelen Alves de.

Morfometria do cerebelo de ratos machos UChA e UChB submetidos a separação materna neonatal (consumidores voluntários de etanol) / Suelen Alves de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2008

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Co-orientador: Marcelo Martinez

Assunto CAPES: 20202008

1. Marcadores morfológicos e moleculares 2. Etanol 3. Alcoolismo - Estudos experimentais

CDD 615.9

Palavras-chave: Cerebelo; Etanol; Ratos UCh; Separação materna

Dedicatória

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

À DEUS, fonte de luz, que concedeu-me coragem e perseverança para atingir meus objetivos.

Aos meus pais, Aurea Isabel Vendrame de Oliveira e Antonio Alves de Oliveira, pelo apoio incansável e inabalável, por acreditarem em meus sonhos e estarem ao meu lado em todas as minhas decisões.

A minha irmã Jaqueline Alves de Oliveira pela amizade, compreensão e companheirismo.

Ao meu amor e amigo, Danilo... Pelos momentos únicos de apoio e paciência, quando achava que não conseguiria mais e você me fortalecia.

Dedico a vocês esse trabalho

Suelen Alves de Oliveira

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez, pela orientação e pelo exemplo de docente e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Marcelo Martinez, meu co-orientador, por toda dedicação, pela confiança, pelo carinho e paciência durante os anos de graduação e por todo o mestrado, pelas minhas conquistas acadêmicas e pessoais. Saiba que eu o admiro muito!

À Prof^a. Dra Maira Aparecida Stefanini, brilhante docente, exemplo de superação, garra e sabedoria. Agradeço pela valiosa colaboração no desenvolver de meu trabalho, pela paciência, amizade e apoio nos momentos decisivos.

À Prof^a. Dra Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, pelo incentivo, ensinamentos, exemplo de competência e amizade.

A todos os professores do Programa de PG da BGA que direta e indiretamente contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade.

As minhas amigas de trabalho, Ana Cláudia, Débora, Juscara, Lucimare, Priscila e Vanessa, que estiveram ao meu lado durante todos esses meses, me incentivando e apoiando, registro aqui, a minha gratidão e amizade. Vocês foram para mim coragem, sensibilidade, força e equilíbrio em momentos difíceis.

A minha madrinha, Roseli Aparecida Vendrame Mechan Ferraz, pelo amor e paciência.

Ao auxiliar acadêmico Gelson Rodrigues do Departamento de Anatomia IBB/UNESP e ao servidor público Wanderley Thiago da Silva (Biotério Central) pelo auxílio durante o processamento dos materiais.

A Prof^a. Dra. Tânia de Fátima Salvini por toda a contribuição dada ao projeto e principalmente por ceder as instalações do laboratório de pesquisa de Plasticidade Muscular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, onde foi processada parte do material.

Aos membros do grupo de pesquisa Biologia da Reprodução do Departamento de Anatomia IBB/UNESP, por todas as contribuições na execução do projeto.

As secretárias do Departamento de Anatomia Jerusa Verpa, Cleuza Andrade Freitas e Jackeline Vieira por todo o auxílio e contribuição.

Aos secretários da seção da Pós-Graduação por todos os serviços realizados e pela amizade durante este período.

Ao programa de pós-graduação Biologia Geral Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

Aos amigos do programa de pós-graduação pelo auxílio prestado e atenção.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pela execução e compreensão dos cálculos estatísticos

LISTA DE ABREVIACÕES

ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico
ADH = Enzima álcool desidrogenase
ALDH = Enzima aldeído desidrogenase
AP = Eixo antero-posterior
AVP = Arginina vasopressina
CO = Controle (Wistar)
CRH = Hormônio liberador de corticotrofinas
E = Dia embrionário
GABA = Ácido gama-amino-butírico
HE = Hematoxilina e eosina
HHA = Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
LG-ABN = do inglês (*Licking/grooming and archedback nursing*)
MEOS = Sistema microsomal de oxidação do etanol
ML = Eixo médio-lateral
NAD = Nicotiamida adenina dinucleotídeo
P = Dia pós-natal
PVN = Núcleo paraventricular
SHRP = Período hiporresponsivo ao estresse
SM = Separação materna
SMCO = Grupo Separação materna controle
SMUChA = Grupo Separação materna UChA
SMUChB = Grupo Separação materna UChB
SNC = Sistema nervoso central
UCh = Universidade do Chile
UChA = Modelos de alcoolismo experimental com baixo consumo voluntário de etanol (0,1-2 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia)
UChB = Modelos de alcoolismo experimental com alto consumo voluntário de etanol (4-7 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	
Divisão cerebelar filogenética	22
FIGURA 2	
Padrão de foliação cerebelar	29

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE FIGURAS

RESUMO	9
ABSTRACT	10
I INTRODUÇÃO	11
1 Stress	12
1.1 Estresse e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)	12
1.2 Modelos experimentais relação mãe-filhote	13
1.2.1 Período hiporresponsivo ao estresse	15
2 Estresse e alcoolismo	16
2.1 Mecanismo de ação do etanol sobre o organismo	17
2.2 Metabolismo do álcool	18
3 Modelos Experimentais	19
3.1 UChA e UChB - Justificativa para escolha do animal	21
4 Cerebelo	21
4.1 Anatomia macroscópica	21
4.2 Histologia do cerebelo	23
4.3 Conexões cerebelares	24
4.3.1 Conexões extrínsecas e organização morfo-funcional	26
4.4 Considerações funcionais	27
4.5 Cerebelo do rato	28
5 Cerebelo e alcoolismo	30
6 Justificativa e objetivos	34
II REFERÊNCIAS	35
III ARTIGO	44
IV CONCLUSÕES	75

RESUMO

Experiências traumáticas na infância estão associadas ao aumento do risco de abuso de álcool e de outras drogas na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse. A exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Sendo o cerebelo local de ação do etanol, onde o consumo de forma abusiva altera o equilíbrio e a coordenação motora e que vários aspectos do alcoolismo podem ser frutos do estresse vivido precocemente, este trabalho buscou investigar e avaliar se a separação materna neonatal, aplicada em filhotes machos de ratos UChA e UChB, potencializa os efeitos tóxicos da ingestão crônica de álcool sobre a morfometria dos estratos cerebelares dos animais estudados. Para isso, utilizou-se modelo de alcoolismo experimental (ratos UChA e UChB) e de indução de hiper-reatividade do eixo HHA (Separação Materna). Foram realizadas análises microscópicas e morfométricas. Para morfometria as variáveis estudadas foram: massa corpórea(g), consumo de álcool(g/Kg/dia), altura do córtex cerebelar (μm), altura do estrato molecular(μm), granuloso (μm), purkinjense (μm) e áreas dos citoplasmas das células de Purkinje (μm^2). O estresse neonatal não alterou o padrão de consumo de etanol das linhagens UChA e UChB, houve alterações nos níveis plasmáticos de corticoesterona. O córtex cerebelar dos animais UCh mostrou-se menor que no Wistar, sendo a SM fator protetor para atrofia desta região nos grupos SMUChA e SMCO. Os estratos granular e purkinjense mantiveram o padrão de alteração do córtex cerebelar, com a SM atenuando os efeitos do consumo crônico de etanol. Já a camada molecular encontrou-se maior nos animais UChB, onde após indução de hiper-reatividade do eixo HHA ocorreu a atrofia deste grupo. Portanto, conclui-se que o etanol interage com a SM sobre a estrutura do córtex cerebelar dos ratos UCh.

Palavras chaves: Cerebelo, Etanol, Separação Materna, Ratos UCh

ABSTRACT

Traumatic experiences in the childhood are associated to an increase in the risk of alcohol and other drugs abuse in the adolescence and in the adulthood. Abused children and adolescents manifest diseases in their biological system in response to that stress. The chronic exposition to stressing factors increases the activity of the hypothalamus-hypophysis-adrenal axis (HHA). The ethanol acts in the cerebellum where the abusive consumption alters the balance and the motor coordination; that is, many aspects of the alcoholism might be consequences of the stress experienced in early years. This research investigated and evaluated if the neonatal maternal separation, applied to UChA and UChB male rats, potentializes the toxic effects of the alcohol chronic ingestion on the cell morphometry of cerebellar extracts in the studied animals. For that, both, the experimental alcoholism model (UChA and UChB rats) and the hipper-reactivity induction of the HHA axis (Maternal Separation) were used. Microscopic and morphometrics analysis were also accomplished. For morphometry, the variables analyzed were: corporal mass (g), alcohol consumption (g/Kg/day), cerebellar cortex height (um), molecular extract height (um), granular (um), Purkinje fibers (um), and cytoplasm areas of the Purkinje cells (um²). The neonatal stress did not alter the ethanol consumption pattern of the UChA and UChB lineages; however, there were alterations in the corticosterone plasmatic levels. The cerebellar cortex of the UCh animals have shown to be smaller than the Wistar ones, and the SM has shown to be a protecting factor for this region atrophy in the SMUChA and SMCO groups. The granular and Purkinje fiber extracts have kept the cerebellar cortex alteration patterns, having the SM lessen the effects of the ethanol chronic consumption. The molecular layer was bigger in the UChB animals, where after the hipper-reactivity induction of the HHA axis there was an atrophy of this group. Therefore, it is assumed that the ethanol interacts with the SM on the structure of the cerebellar cortex in UCh rats.

Key words: Cerebellum, Ethanol, Maternal Separation, UCh Rats

Introdução

I INTRODUÇÃO

1 Estresse

Situações intrínsecas ou extrínsecas que ameaçam a homeostase orgânica desencadeiam respostas adaptativas constituindo os sistemas de estresse, formado de diversas reações físicas e mentais que se contrapõem ao estímulo estressante e visam restabelecer o equilíbrio perdido (homeostasia). As respostas ao estresse são caracterizadas por mudanças comportamentais e físicas, coordenadas pela integração do sistema nervoso central com sistemas periféricos (CHROUSOS e GOLD, 1992; STRATAKIS e CHROUSOS, 1997; LEVINE, 2000).

1.1 Estresse e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)

Selye foi pioneiro da área de estresse e em 1956 fez referência aos hormônios adrenocorticais como os principais componentes da resposta ao estresse (LEVINE, 2000). Nos mamíferos, a manutenção da homeostase ocorre pela ação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), em conjunto com os núcleos noradrenérgicos do sistema nervoso central (SNC), o sistema autônomo simpático e o sistema límbico (hipocampo e corpo amigdalóide). (AKIL e MORANO, 2000).

Os estímulos estressores convergem para os neurônios parvocelulares de divisão medial do núcleo paraventricular (PVN) do hipocampo médio basal (AKIL & MORANO, 2000), onde favorecem a ativação ou a inativação do eixo HHA, por ação dos glicocorticóides (HERMAN e CULLINAM, 1997; revisão de AKIL e MORANO, 2000).

O controle inadequado dos glicocorticóides na resposta ao estresse representa uma ameaça orgânica e para a saúde. Sua hipersecreção desencadeia disfunções fisiológicas e psicológicas, implicando em patologias de desordens sistêmicas (colites, asma e

hipertensão), afetivas (depressão, estresse pós-traumático) e neurodegenerativas (Alzheimer) (HERMAN e CULLINAM, 1997).

A inativação do sistema de estresse reside na capacidade dos glicocorticóides inibirem a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), promovendo retroalimentação negativa dos neurônios parvocelulares do PVN, com diminuição das concentrações de RNAm para hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) e arginina vasopressina (AVP), além da inibição do hipocampo (MEANEY et al., 1993).

Assim como a ativação do eixo HHA é essencial para a manutenção da vida, sua inativação também se faz necessária. A exposição contínua a concentrações elevadas de glicocorticóides representa risco para o organismo ao determinar a supressão dos processos anabólicos e imunológicos, gerando patologias (diabetes esteroideal, amenorréia, hiperlipidemia, impotência sexual, entre outras) e distúrbios do sistema nervoso central (MEANEY et al., 1993; AKIL e MORANO, 2000).

1.2 Modelos experimentais de relação mãe-filhote

Eventos estressantes durante as primeiras fases do desenvolvimento contribuem significativamente para tornar o adulto vulnerável a psicopatologias. Os cuidados paternos visam proteger a criança, porém a privação da presença dos pais, especialmente materna, pode romper com essa proteção (DE BELLIS et al., 1999; HEIM e NEMEROFF, 2001; NEWPORT et al., 2002; GLUCKMAN et al., 2005; MEIJER, 2006). Traumas e negligências na infância exercem influências no comportamento emocional e riscos para o desenvolvimento de depressão, ansiedade e abuso de substâncias químicas (KENDLER et al., 1995; DUBE et al., 2001; HEIM e NEMEROFF, 2001).

Modelos animais, embora com limitações, são ferramentas importantes à pesquisa psiquiátrica por oferecerem vantagens em relação às pesquisas com seres humanos.

Experimentos com roedores, que possuem período gestacional breve, facilitam o acompanhamento do desenvolvimento, permitem manipulações específicas do ambiente e medidas invasivas das atividades biológicas. Perturbações durante o período de cuidados maternos com a ninhada, produzem impactos prejudiciais e persistentes na prole. Fatores estressantes, incluindo separação materna, geram comportamento característico de ansiedade e desordem afetiva. Tal paradigma de estresse induz, uniformemente, hiper-responsividade persistente no eixo HHA, secundária a hipersecreção do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) (NEWPORT et al., 2002).

Nos mamíferos a mãe é fonte nutricional do infante, no entanto, a relação complexa infante-mãe não se resume a suprir necessidades nutricionais. A mãe provê estímulos essenciais térmicos, somatossensórios, olfatórios, visuais e auditivos durante o desenvolvimento pós-natal. O ambiente produz impactos que influenciarão animais e seres humanos neurobiologicamente e psicologicamente a vida inteira (DE BELLIS et al., 1999; TEICHER, 2000; PRYCE e FELDON, 2003).

O modelo de experimentação, inicialmente utilizado, relacionado ao efeito do estresse neonatal na vida adulta, foi denominado de Manipulação Neonatal. Nele, filhotes de roedores são removidos diariamente, durante 15 minutos, de suas caixas e rapidamente manuseados pelo pesquisador. Como resultado, os filhotes apresentam diminuição dos comportamentos de ansiedade e das respostas biológicas a estressores quando adultos. Filhotes manipulados são resistentes ao estresse e à diminuição temporal da capacidade cognitiva, exibem alto nível de comportamento exploratório em ambientes novos e demonstram atenuada ativação dos circuitos neuronais de estresse na vida adulta (PRYCE et al., 2001; NEWPORT et al., 2002; PRYCE e FELDON, 2003). Segundo Newport et al. (2002), a manipulação melhora a adaptabilidade do rato a subseqüentes estressores, visto que

o breve afastamento da mãe produz aumento dos cuidados maternos à prole e causa efeito modulador no eixo HHA, gerando resposta branda no animal adulto.

Outro modelo utilizado denomina-se Separação Materna (SM). Os filhotes são separados da mãe em intervalos superiores à uma hora, no pós-natal, antes do desmame. Assim, ficam privados dos cuidados maternos pelo período de até 24 horas e sofrem pela alteração do comportamento materno aberrante, que persiste após a reunião mãe-filhotes. A SM induz alteração na atividade do eixo HHA, aumentando as concentrações séricas de ACTH e de corticosterona. São observadas diferentes alterações neurobiológicas conforme as variedades de modelos de Separação Materna, no entanto, quando ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, as alterações tornam-se duradouras e podem ser fator de risco à psicopatologias na vida adulta (PRYCE et al., 2001; NEWPORT et al., 2002; PRYCE e FELDON, 2003; SCHMIDT et al., 2004).

1.2.1 Período hiporresponsivo ao estresse

No rato, nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, os conteúdos basais do hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) hipotalâmico, do adrenocorticotrófico (ACTH) hipofisário e a concentração plasmática de corticosterona são baixas. Nesse período, denominado de hiporresponsivo ao estresse (SHRP), um estímulo que em animais adultos resultaria em aumento significativo das concentrações plasmáticas de ACTH e corticosterona não é capaz de fazê-lo. A baixa responsividade do eixo HHA tem sido atribuída ao aumento da eficácia da retroalimentação negativa exercida pela corticosterona, principalmente sobre o hipocampo. O SHRP é crítico no desenvolvimento neural, no qual processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular prevalecem no cérebro e sistemas de neurotransmissão inibitória e excitatória alcançam a maturidade (GONZALES et al., 1994). Permite o desenvolvimento do sistema nervoso central na ausência de

hipersecreção de glicocorticóides, que acarretariam diminuição das mitoses, da mielinização, da neuromorfogênese e do tamanho cerebral, prejudicando as funções neuroendócrinas (LEVINE, 1994, 2001). Há vários protocolos experimentais descritos na literatura, comumente os procedimentos desenvolvidos durante o SHRP são denominados de estimulação neonatal (MAZARO, 2003), que podem desinibir o eixo HHA, possibilitar ao rato neonatal responder a fatores estressantes brandos e desencadear alterações neurobiológicas, conforme o modelo de estimulação neonatal utilizado, representando risco significativo de psicopatologias na vida adulta (SMITH et al., 1997; LEVINE, 2001; LEHMANN et al., 2002; SCHMIDT et al., 2004).

2 Estresse e alcoolismo

O Acoolismo pode ser definido como síndrome multifatorial, com comprometimento físico, mental e social (EDWARDS e GROSS, 1976; EDWARDS et al., 1976). Os critérios diagnósticos atuais são baseados na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (1993), e no Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

Cerca de 5% das mulheres e 10% dos homens apresentam síndrome de dependência do álcool ou alcoolismo. O etanol está relacionado com 50% dos casos de morte em acidentes automobilísticos, 50% dos homicídios e 25% dos suicídios (NETO, 2003).

O consumo abusivo de álcool traz consequências negativas a saúde e qualidade de vida, aumenta a frequência de morbidades que causam morte ou limitações funcionais, como cirrose, carcinomas, acidente vascular cerebral, violências e transtornos mentais

(NANCHAHAL et al., 2000; REHM et al., 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Tem sido demonstrado o componente genético para dependência e consumo alcoólicos, sendo descritos genes responsáveis, ao menos em parte, pelo alcoolismo. São estudados principalmente os genes para enzimas envolvidas no metabolismo alcoólico (álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase) e aqueles dos receptores cerebrais afetados pelo etanol (receptores GABA). Porém, a herança dos problemas relacionados ao álcool não segue um padrão de dominância ou recessividade mendeliana, mas resulta de efeitos integrados e cumulativos de múltiplos genes (LI et al., 2001; RHEE et al., 2003; WHITFIELD, 2005; WORST e VRANA, 2005).

Apesar da predisposição ao alcoolismo, o ambiente familiar é capaz de moderar o impacto de alto risco genético em desenvolver desordens relacionadas ao consumo de etanol (JACOB et al., 2003). Segundo Gordis (2000), uma das questões mais proeminentes na pesquisa sobre o alcoolismo é a recíproca combinação de estudos comportamentais e biológicos, a fim de entender a interação da expressão genética com o ambiente na manifestação do alcoolismo.

Experiências traumáticas na infância precoce estão associadas ao aumento do risco de abuso de álcool e outras substâncias nocivas na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse, incluindo influências deletérias no desenvolvimento cerebral. Esses distúrbios podem ser a causa do aumento do risco de abuso de álcool durante a adolescência e na vida adulta (DE BELLIS, 2002; ROMAN et al., 2004).

2.1 Mecanismo de ação do etanol sobre o organismo

Os mecanismos de ação do etanol sobre diferentes órgãos-alvo permanecem sem resposta, porém há hipóteses da ação do álcool sobre a estrutura orgânica, tissular ou celular: (1º) por ação direta sobre a maquinaria celular com reflexos diretos sobre os tecidos e os órgãos, ou (2º) como consequência do decréscimo no consumo de alimento sólido e ingestão de líquido, especialmente em roedores dos grupos alcoólicos, ou seja, animais que recebem soluções de etanol através de diferentes vias de ingestão. Dessa forma, o etanol, por suprir carga energética extra, dissociada de uma alimentação adequada (anorexia), e também por gerar alterações gastrointestinais e hepáticas (OLIVEIRA e FERREIRA, 1987), acabaria por acarretar distúrbios em diferentes órgãos, como os processos de esteatose, seguidos de cirrose hepática.

2.2 Metabolismo do álcool

O consumo crônico de álcool, no homem e no rato, está associado ao aumento do retículo endoplasmático liso no fígado, possível local de oxidação do etanol (GAYOTTO e ALVES, 2001). O álcool depois de absorvido pelo trato gastrointestinal é transportado através da circulação portal ao fígado onde é oxidado. Apenas 2 a 10% da quantidade absorvida é eliminada pelos rins e pulmões (LIEBER, 1993).

No hepatócito, há três vias metabólicas com a capacidade de oxidar o etanol em aldeído acético, (1ª) o sistema da enzima álcool desidrogenase (ADH) na matriz citoplasmática, (2ª) o sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso e o da (3ª) catalase nos peroxissomos (LIEBER, 1993).

O sistema da ADH é responsável pela eliminação do álcool produzido pela fermentação bacteriana no intestino e é a principal via metabólica para a transformação do etanol em aldeído acético (KITSON, 1996).

A catalase é capaz de oxidar o etanol *in vitro* na presença de peróxido de hidrogênio, porém sob condições fisiológicas, a enzima não parece ter papel relevante no metabolismo humano (LIEBER, 1993).

Independente da via metabólica, o etanol é convertido em aldeído acético e depois em acetato. O acetato é lançado na corrente sanguínea, sendo rapidamente metabolizado nos tecidos extra-hepáticos em dióxido de carbono e água. A enzima aldeído desidrogenase (ALDH) é responsável pela oxidação de aproximadamente 90% do aldeído acético formado pelo metabolismo do etanol (LIEBER, 1993).

Na oxidação do etanol mediada pela ADH e a do aldeído acético mediada pela ALDH, há transferência de íons de hidrogênio do etanol para o co-fator nicotiamida adenina dinucleotídeo (NAD), sendo convertido para sua forma reduzida NADH. Nesses processos, há excesso de NADH na matriz citoplasmática do hepatócito, alterando-se a homeostase celular. A manifestação mais freqüentemente relatada no uso excessivo do álcool é o fígado gorduroso. A lipogênese aumentada pode ser considerada como uma forma das células se desfazerem do excesso de íons hidrogênio. A atividade do ciclo do ácido cítrico fica deprimida, pois as mitocôndrias utilizam os equivalentes de hidrogênio originados no metabolismo do etanol como fonte de energia em detrimento dos derivados do metabolismo dos ácidos graxos. A diminuição da oxidação dos ácidos graxos resulta no acúmulo hepático de lipídio (LIEBER, 1991).

3 Modelos Experimentais

Desde a década de 40, pesquisadores têm investigado roedores com preferências ao consumo de álcool. Esses estudos relatam que ratos e camundongos bebem mais álcool do que água em concentrações baixas (até 6% v/v), pela solução de etanol apresentar sabor doce. Em concentrações elevadas, em que o sabor da solução geralmente é

aversivo aos roedores, observou-se diferenças entre indivíduos e entre as linhagens na preferência pela ingestão de álcool, sugerindo que os animais optam ao álcool pelo sabor e não pelo efeito estimulador sobre o sistema nervoso central. A variabilidade na preferência ao etanol entre os indivíduos e entre as linhagens permitiu a seleção de raças de ratos e camundongos para a predileção ao álcool, gerando pares de animais que são caracterizados por consumir níveis baixos ou altos da substância (SPANAGEL, 2000).

Li et al. (1987) relataram a existência de pares de linhagens de ratos de consumo de álcool. Os ratos UChA e UChB (UCh = Universidade do Chile), os de Helsink, iniciados por KALERVO ERIKSSON e os de LUMENG & LI em Indianápolis. As linhagens AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de Helsink foram obtidas por cruzamentos alternados *inbreeding* com *outbreeding*. As linhagens P (*Alcohol Preferring - 5-8g/kg/day*) e NP (*Non-Alcohol-Preferring - menos de 0,5g/kg/dia*) de LUMENG & LI têm sido obtidas por cruzamentos *outbreeding*. Além dessas linhagens de ratos, existem raças de camundongos, sendo as de consumo voluntário de etanol mais elevado a C57BL/6 e a de consumo baixo a BALB e DBA (McCLEARN e RODGERS, 1961).

No modelo UCh os animais têm demonstrado a presença de mecanismos de apetite e saciedade ao álcool com as respectivas redes neuronais envolvidas. A manifestação alcoolismo está subordinada, além da predisposição genética, ao consumo de álcool em grandes quantidades durante longo período, o que torna a linhagem UCh adequado modelo experimental. Esses animais possuem predisposição genética para ingerir voluntariamente pequenas quantidades de etanol a 10%, como o observado em pessoas com o alelo da enzima ADH*2 ($\beta_2\beta_2$) que geralmente não consomem bebidas alcoólicas pela alta frequência de reações adversas. Há, pelo menos, dois caminhos importantes para o enfoque dos estudos sobre o alcoolismo humano: 1) busca de marcadores genéticos que indiquem a predisposição

ao alcoolismo e 2) busca de terapêuticas eficazes para o tratamento do alcoolismo (MARDONES, 1993).

3.1 UChA e UChB - Justificativa para escolha do animal.

As variedades UChA e UChB são linhagens puras de ratos Wistar selecionados geneticamente e constituem modelos raros para os trabalhos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do álcool, tão bem quanto ao apetite e a tolerância que são importantes características do alcoolismo humano. A linhagem escolhida aproxima-se da realidade da dependência crônica humana ao etanol, uma vez que os animais apresentam consumo voluntário de etanol.

4 Cerebelo

4.1 Anatomia macroscópica

O cerebelo é originário da parte dorsal do metencéfalo e situa-se dorsalmente ao bulbo e a ponte, contribuindo para formação do teto do IV ventrículo. Repousa sobre a fossa cerebelar do osso occipital, comunica-se à medula e ao bulbo pelo pedúnculo cerebelar inferior, à ponte e o mesencéfalo pelos pedúnculos cerebelares médios e superiores (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; CONSENZA, 2005). Anatomicamente, distingue-se no cerebelo uma porção ímpar e mediana, o verme, ligado a duas grandes porções laterais, os hemisférios cerebelares. Sua superfície apresenta sulcos de direção predominantemente transversais que delimitam lâminas finas denominadas folhas do cerebelo. Existem também sulcos mais pronunciados, as fissuras do cerebelo, delimitando lóbulos, podendo conter várias folhas (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; COSENZA, 2005).

De acordo com Larsell (1970), o cerebelo de todo mamífero pode ser dividido em dez lóbulos básico, numerados com algarismos romanos de I a X, da região anterior para

posterior, adicionalmente subdivididos em lóbulos secundários e terciários. A proposta baseia-se principalmente na ontogênese do órgão e leva em consideração o fato de que a primeira fissura a aparecer durante o desenvolvimento do cerebelo é a póstero-lateral, dividindo-o em duas partes desiguais: o lóbulo flóculo-nodular e o corpo do cerebelo. Seguido do surgimento da fissura prima que separa o corpo do cerebelo em lobos anterior e posterior (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; COSENZA, 2005).

Outra forma de divisão cerebelar é a filogenética, cuja compreensão exige o conhecimento de alguns aspectos da filogênese do órgão, sendo reconhecidas três divisões, correlacionadas à complexidade dos movimentos realizados pelo grupo de vertebrados característicos de cada fase (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003):

- Arquicerebelo: consiste no lóbulo flóculo-nodular junto à região adjacente do verme inferior (úvula), presente nos peixes e anfíbios inferiores (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003) (Figura 1);
- Paleocerebelo: representado pelo verme superior no lobo anterior e pelo verme inferior no lobo posterior. Encontra-se em anfíbios superiores e maior em répteis e aves. (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003) (Figura 1);
- Neocerebelo: formado pelos hemisférios cerebelares juntamente com o verme superior do lobo posterior, presente em mamíferos e maior nos humanos. (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003) (Figura 1).

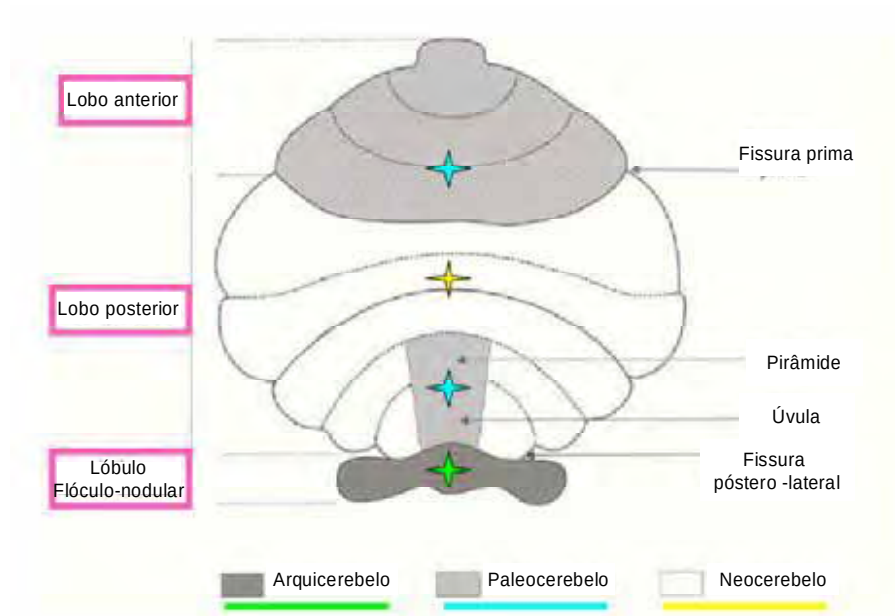


Figura 1. Divisão cerebelar filogenética.
Fonte: MACHADO, 2002

Nos mamíferos, a porção medial do cerebelo (vermelha) possui padrão de foliação ao longo do eixo antero-posterior (AP) distinta das extensões laterais (hemisférios), com zona intermediária separando-os (zona paravermal). Lateralmente, estão o flóculo e nóculo, estendendo-se da porção ventral do cerebelo posterior, com foliação diferente das demais regiões. A referência morfológica pode ser usada para dividir o cerebelo no eixo médio-lateral (ML) em quatro regiões distintas molecularmente, funcionalmente (CHEN et al., 1996) e com padrão de terminações aferentes (CHOCKKAN e HAWKER, 1994; HALLEM et al., 1999). Anatômica e fisiologicamente, o cerebelo adulto é funcionalmente compartimentalizado dentro de grupos ao longo do eixo ML. Esses agrupamentos aparecem como estrutura básica na qual as funções cerebelares são executadas (HASHIMOTO e MIKOSHIBA, 2003).

4.2 Histologia do cerebelo

O cerebelo está entre os órgãos mais complexos do sistema nervoso central dos mamíferos (ITO, 1984; MANCINI et al., 1985; LAFARGA et al., 1986; LEE et al., 2001). Constituído de centro de substância branca, corpo medular do cerebelo, composto de núcleos cerebelares de onde irradiam lâminas brancas revestidas externamente por fina camada de substância cinzenta, o córtex cerebelar (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003), formado principalmente por dois tipos de neurônios: as células granulares e de Purkinje (ALTMAN, 1972a,b,c; VOOGD e GLICKSTEIN, 1998). O córtex cerebelar é histologicamente homogêneo e possui citoarquitetura caracterizada por três estratos: molecular, purkinjense e granuloso (VOOGD, 2003).

O estrato molecular é superficial, constituído de fibras em direção paralela, células estreladas e em cesto. Apresentam sinapses axossomáticas em torno do corpo das células de Purkinje (VOOGD e GLICKSTEIN, 1998; MACHADO, 2002)

O estrato purkinjense representa o elemento dominante no processo de informação cerebelar (APFEL, 2002). As células de Purkinje são piriformes e grandes, dotadas de dendritos que se ramificam na camada molecular e axônio em direção oposta, terminando nos núcleos centrais do cerebelo mediante ação inibitória (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003).

O estrato granuloso é formado por células granulares ou grânulos do cerebelo, neurônios pequenos com citoplasma reduzido, extremamente numerosos. Têm vários dendritos e um axônio que, ao atingir a camada molecular, bifurca-se em T originando as fibras paralelas que estabelecem sinapses com os dendritos das células de Purkinje. Ademais, na camada granular identificam-se as células de Golgi. (MACHADO, 2002).

4.3 Conexões cerebelares

Três classes de projeções aferentes do cerebelo emitem sinais para todos os lóbulos. A primeira classe são as fibras musgosas, originadas de regiões do encéfalo e medula espinal. Seus axônios são enviados ao cerebelo dos núcleos pontino, vestibular, retículo lateral, cutâneo externo e por todos os segmentos da medula espinal. Dependendo da origem, as terminações podem ser cutâneo-cerebelares ou espino-cerebelares, restritas a lóbulos específicos e a domínios ML. A segunda classe de conexões aferentes são as fibras trepadeiras do complexo olivar inferior com terminações nervosas na camada molecular, interagindo junto às células de Purkinje. A última classe inclui as aferentes noradrenérgicas do *locus ceruleus*, as colinérgicas dos núcleos pedúnculo-pontino e as serotoninérgicas dos núcleos da *raphe*. Situam-se nos estratos do córtex cerebelar e possuem organização semelhante médio-lateral (SILLIOTOE e JOYNER, 2007).

As conexões intrínsecas do cerebelo ocorrem por dois tipos de fibras aferentes que chegam ao córtex cerebelar. As fibras trepadeiras enrolam-se aos dendritos das células de Purkinje, mediante ação excitatória. As musgosas, ao penetrarem no órgão, emitem ramos colaterais que fazem sinapses excitatórias com os neurônios dos núcleos cerebelares. No estrato granuloso, se ramificam terminando em sinapses excitadoras axodendríticas com grande número de células granulares que, através das fibras paralelas, se ligam às células de Purkinje e constituem circuito cerebelar básico. As células de Purkinje, de Golgi, estreladas e as em cesto, possuem ação inibitória e atuam pela liberação do ácido gama-amino-butírico (GABA). As células granulares, únicas com função excitatória do córtex cerebelar, tem como neurotransmissor o glutamato (MACHADO, 2002).

Os núcleos cerebelares localizam-se na substância branca (MACHADO, 2002). O núcleo do fastígio fica próximo ao plano mediano em relação com o ponto mais alto do teto do IV ventrículo. O denteado é o maior dos núcleos centrais e se posiciona lateralmente. Entre esses dois, encontram-se os núcleos emboliforme e globoso, semelhantes

do ponto de vista funcional e estrutural. A informação é processada grosseiramente nos núcleos centrais e aprimorada por impulsos recebidos do córtex (MACHADO, 2002; KIERNAN, 2003).

4.3.1 Conexões extrínsecas e organização morfo-funcional

O cerebelo recebe aferências dos núcleos vestibulares, medula espinal, formação reticular, núcleos pontinos e do complexo olivar inferior (CONSENZA, 2005). Envia respostas por conexões eferentes que influenciam os neurônios motores da medula de forma indireta e atuam por intermediários de áreas do tronco encefálico, tálamo ou regiões motoras do córtex cerebral. As projeções eferentes do cerebelo são provenientes de três núcleos centrais que interagem com os axônios das células de Purkinje das três zonas longitudinais do corpo cerebelar (MACHADO, 2002; KEIRNAN, 2003; CONSENZA, 2005).

O cerebelo vestibular ocupa-se basicamente da manutenção do equilíbrio corporal. Representado pelo lóbulo flóculo-nodular, recebe fibras originadas nos receptores do labirinto da orelha interna, informando a posição e os movimentos cefálicos. Essas aferências podem ser diretas ou indiretas ao cerebelo com sinapse nos núcleos vestibulares. O córtex do lóbulo flóculo-nodular processa as informações e comunica-se aos núcleos vestibulares através do axônio das células de Purkinje. Origina o tracto vestibulo-espinal que influencia os neurônios motores da medula, porção medial, e atua sobre a musculatura proximal. Os núcleos vestibulares formam fibras que participam do mecanismo de controle dos movimentos oculares pelo fascículo longitudinal medial (COSENZA, 2005; KIERNAN, 2003).

O cerebelo espinal supervisiona a manutenção do tônus muscular, necessário à permanência da postura corporal. Recebe informações do corpo em função da medula, através tractos espinocerebelares anterior e posterior que se dirigem ao córtex do lobo anterior e

porções do verme do lobo posterior do cerebelo. Após processamento das informações, o córtex cerebelar comunica-se aos núcleos do fastígio, emboliforme e globoso. Emitem conexões para o tronco encefálico: o núcleo do fastígio para os núcleos vestibulares e formação reticular, os núcleos emboliforme e globoso para o núcleo rubro (COSENZA, 2005; KIERNAN, 2003).

O cerebelo cortical é importante na coordenação e planejamento da motricidade. Regiões do córtex cerebral enviam fibras aos núcleos pontinos através do tracto cortico-pontino, associado às áreas ligadas aos processamentos sensoriais ou regiões de associação, córtex pré-frontal. Os núcleos pontinos fazem sinapses com porções laterais do córtex cerebelar. A informação é processada e encaminhada aos núcleos denteados, que se ligam ao tálamo e emitem fibras para áreas do córtex cerebral com funções motoras e, também, em porções que deram início ao circuito. O circuito cortico-ponto-cerebelo-tálamo-cortical influencia o córtex cerebral, porção motora, que origina o tracto córtico-espinhal responsável pelos movimentos voluntários e atua na porção muscular distal (COSENZA, 2005; KIERNAN, 2003).

4.4 Considerações funcionais

O cerebelo é coordenador da motricidade, compara as ordens emanadas dos centros superiores e os movimentos executados, providenciando que sejam suaves, harmônicos e eficazes (COSENZA, 2005). Regula o movimento e o equilíbrio, ajusta informações e recebe aferências dos sistemas motores descendentes do cérebro (GHEZ, 1991). A manutenção do equilíbrio e da postura ocorre basicamente pelo arquicerebelo e zona medial (verme). O controle dos movimentos voluntários envolve duas etapas: planejamento do movimento, elaborada na zona lateral do órgão por informações trazidas via cortico-ponto-cerebelar e outra de correção do movimento, de responsabilidade da zona intermédia do

cerebelo, a qual compara as características do movimento em execução ao plano motor e promove correções via interpósito – tálamo – cortical (MACHADO, 2002). Lesões, nessa região, provocam distúrbios da coordenação nos movimentos dos membros (ataxia) e olhos (nistagmo), decomposição dos movimentos, déficit de equilíbrio e redução de tônus muscular, acarretando hipotonia (GHEZ, 1991; COSENZA, 2005).

A integração da atividade motora do cerebelo inclui o controle da linguagem, vez que está ligado à iniciação, planejamento e ritmos dos movimentos musculares voluntários dos órgãos fonoarticulatórios e alterações neurais resultam em disartria (SCHMAHMANN, 1991).

O aprendizado motor ocorre por fibras olivo-cerebelares, trepadeiras, que fazem sinapses com as células de Purkinje (MACHADO, 2002). Possui papel importante na aquisição da memória de procedimentos, controle visceral, processos sensoriais, de atenção, linguagem e de outros sistemas comportamentais, no entanto, sua forma de atuação não está evidente. Especula-se que sua função seria comparar e preparar o sistema nervoso para aquisição e análise de informações, além da ação propriamente dita. Atuaria como um sistema computacional, capaz de detectar, prevenir e corrigir erros, nos processos motores ou cognitivos (COSENZA, 2005).

O cerebelo, não obstante constitua apenas 10% do volume total do encéfalo, contém mais da metade de todos os neurônios do sistema nervoso central (GHEZ, 1991). Estudos apontam sua participação na cognição, desenvolvimento e alterações psiquiátricas (RAPOPORT et al., 2000), possuindo conexões via tálamo para áreas encefálicas relevantes a esses processos (DOLAN, 1998; MIDDLETON e STRICK, 1997).

4.5 Cerebelo do rato

O neuroepitélio do cerebelo passou por transformações genéticas e estruturais, produzindo complexa estrutura foliada (ZERVAS et al, 2004). Surge da porção dorsal do metencéfalo, no nono dia embrionário (E9) no rato (MILLET et al., 1996; WINGATE e HATTEN, 1999; ZERVAS et al., 2004). Entre E9 e E12 uma rotação de 90° converte o eixo antero-posterior (AP) do tubo neural dorsal dentro do eixo médio-lateral (ML) do cerebelo primitivo, o qual adquire forma morfológica semelhante à de uma asa (SGAIER et al., 2005). Em torno do E15.5, exibe organização ML na forma de domínio molecular parasagital. Sua complexidade é adquirida no E17, momento em que se iniciam quatro fissuras, separando o órgão em cinco folhas ao longo do eixo AP. No E18.5, o cerebelo apresenta arquitetura tridimensional, com folhas AP cruzadas pelo domínio molecular ML. No nascimento do animal, o circuito cerebelar tem estabelecido grupo rudimentar de conexões sinápticas que começam a se organizar topograficamente dentro das folhas AP e domínios moleculares ML. Por volta do décimo sexto dia pós-natal (P16), seus tipos celulares situam-se em camadas e a morfologia do lóbulo externo e domínios moleculares são correlacionados com a localização do circuito cerebelar específico (SILLITOE e JOYNER, 2007).

A proliferação dos precursores neurais na zona ventricular acontece quase exclusivamente na vida intra-uterina do roedor, enquanto que os da camada granular externa têm sua proliferação no período neonatal (SOTELO, 2004). Os primeiros neurônios da zona ventricular a serem gerados são os núcleos cerebelares e as células de Purkinje (ALTMAN, 1972b). Tais, geradas em três dias de vida intra-uterino, entre os dias embrionários 11 a 13 (E₁₁-E₁₃), e migram imediatamente para porção cerebelar (E₁₂-E₁₅) (HASHIMOTO & MIKOSHIBA, 2003; SOTELO, 2004). Durante o período de desenvolvimento, o cerebelo é susceptível a danos por uma variedade de aplicações como hipóxia (MANCINI et al., 1985; LEE et al., 2001), irradiação pré-natal (LI et al., 2001), álcool (GOODLETT et al., 1998; MIKI et al., 1999; CHEN e HARLE, 2005) e nicotina (CHEN e HARLE, 2005).

O padrão de foliação cerebelar do rato (Figura 2c) é mais complexo que em linhagens de camundongos (Figura 2a,b). Apesar de diferenças nas características morfológicas das espécies, a notável conservação dos lóbulos nos mamíferos sugere que o mecanismo genético básico no processo de foliação se fixe no desenvolvimento evolutivo precoce do cerebelo. (SILLITOE e JOYNER, 2007).

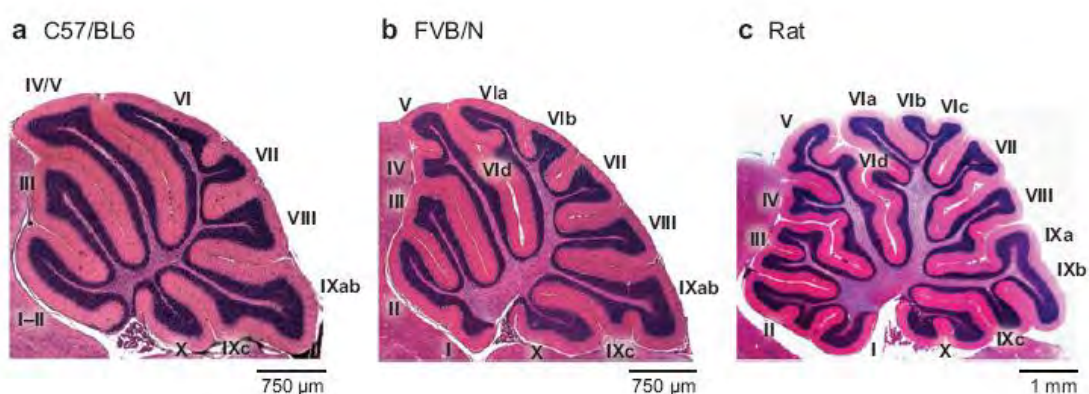


Figura 2. Padrão de foliação cerebelar. (a) C57/BL6. (b) FVB/N. (c) rato. Note maior complexidade da foliação cerebelar do rato (c), que nas demais linhagens de camundongos (a, b).

Fonte: SILLITOE e JOYNER (2007).

5 Cerebelo e alcoolismo

O etanol é uma neurotoxina que altera as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas afetando a embriogênese, migração celular e diferenciação celular. A exposição pré-natal à droga afeta o desenvolvimento do sistema músculo-esquelético, cardiovascular e o sistema nervoso central (SNC) (SILVA, 2006). Esse, no entanto, é mais susceptível à toxicidade pelo álcool, lesando componentes celulares cruciais ao desenvolvimento cerebral, manifestado depois de longo tempo na prole, por malformações craniofaciais, alterações na morfologia e função do SNC (ÖZER et al., 2000; SILVA, 2006).

A formação da rede neuronal funcional no sistema nervoso em desenvolvimento depende de três mecanismos sensíveis à exposição ao álcool: aquisição celular, migração celular e maturação celular. A aquisição celular pode ser diminuída por defeito na proliferação ou aumento na morte celular (ÖZER et al., 2000). De acordo com Costa e Guizzetti (2002), a exposição ao etanol leva a severa morte neuronal por apoptose no hipocampo e no córtex cerebral durante o desenvolvimento.

O consumo de álcool constitui problema social em todo o mundo, devido a efeitos deletérios no organismo e principalmente no sistema nervoso (SILVA et al., 2006). Tem sido relatada a susceptibilidade dos neurônios de Purkinje às variações agudas e crônicas nos níveis sanguíneos do etanol (PENTNEY e DUGLOS, 2000). A atrofia cerebelar frequentemente se associa ao alcoolismo e caracteriza-se clinicamente com ataxia e incoordenação dos membros inferiores. A degeneração cerebelar causada pelo etanol leva a redução das folhas cerebelares e morte neural nas porções superior e anterior do verme, e estende-se ao lobo anterior e lóbulo flóculo-nodular (VICTOR et al., 1971).

Apfel et al. (2002) analisaram o efeito do álcool sobre as células de Purkinje utilizando ratos Wistar que receberam oralmente soluções alcoólicas em diferentes concentrações 4%, 12% e 24%. Os animais foram sacrificados com 4, 8 e 12 semanas e os cerebelos preparados para histologia. Cortes de 6µm (HE) foram analisados por estereologia. A diferença entre a densidade por área e a densidade de superfície das células de Purkinje dos grupos experimentais e respectivos controles foram significativas. Com 12 semanas, a densidade volumétrica da célula de Purkinje diminuiu entre os grupos experimentais e controles nas concentrações de 4% e 12%, mas não para concentração de 24%. Concluíram que o etanol exerceu efeito tóxico sobre o corpo celular de Purkinje nas três concentrações estudadas a partir de 4 semanas.

A exposição ao álcool causa direta toxidade neural, especialmente durante períodos de maior vulnerabilidade cerebral (PIERCE et al., 1999). Experimentos em ratos neonatais têm demonstrado que o cerebelo sofre limitação de crescimento e morte celular induzidos pelo etanol, além de deficiências cognitivas e de memória (GOODLETT et al., 1991).

Napper e West (1995) demonstraram que a exposição ao álcool em concentrações uniformes no sangue, durante período de crescimento rápido do cérebro pode conduzir a um déficit permanente no número de células de Purkinje e células granulosas na região flóculo-nodular do cerebelo. Filhotes de ratos *Sprague-Dawley* foram tratados artificialmente, administrando-se etanol nos dias 4 a 9 pós-natal, período de desenvolvimento do encéfalo similar ao terceiro trimestre humano. Obteram como resultado déficits significativos no número de células de Purkinje e células granulosas, em 115 dias de idade, nos três grupos de tratamento, com déficit significativo de células de Purkinje e granulosas encontrado depois da exposição contínua à concentrações baixas de álcool no sangue. O que suporta a hipótese que a perda neuronal não se correlaciona com o valor dos picos da concentração do álcool do sangue.

Miki et al. (1999) expuseram ratos a doses elevadas de etanol no 5º e 10º dias pós-natal e concluíram que sua ingestão na menor idade afeta células de Purkinje, enquanto aos 10 dias o mesmo não ocorre. Baseados nestes dados estudaram se a exposição ao etanol por um período prolongado após o 10º dia poderia produzir a perda de células de Purkinje. Expuseram ratos neonatais a doses relativamente elevadas (420-430 mg/dl) de etanol por 6 dias entre as idades de 4 a 9 dias ou 10 a 15 dias. Concluíram que, na menor idade, as células de Purkinje do rato são particularmente susceptíveis aos efeitos do etanol. Entretanto, a mesma dosagem da substância por período similar da exposição após 10 dias de vida não leva a alterações significativas no número de células de Purkinje.

O alcoolismo ocasiona modificações que refletem no desenvolvimento das populações celulares da prole. Koksai et al. (2005) estudaram os efeitos do álcool na ultra-estrutura das células de Purkinje fetais de mães tratadas com etanol na gravidez e lactação. Encontraram degeneração das cristas mitocondriais, dilatação brusca dos retículos endoplasmáticos e aparecimento de formas circulares do Complexo de Golgi. A exposição aguda ao etanol na vida intra-uterina não ocasiona a diminuição nos precursores das células granulares e de Purkinje, como ocorrido na síndrome alcoólica fetal produzida pela exposição crônica de ratas prenhas ao etanol (SOUZA et al., 2006).

O cérebro é alvo da teratogenicidade do etanol, podendo ocasionar neurodegeneração de áreas específicas. McGoey et al. (2003) confirmaram a hipótese de que a exposição pré-natal ao alcoolismo crônico produz tempo de curso diferencial de diminuição na densidade linear de células piramidais hipocampais CA1 e células de Purkinje.

Apesar das causas que levam as alterações e redução neural permanecerem indefinidas, a perda de células nervosas induzidas pelo consumo de etanol poderia decorrer da diminuição na proliferação e migração celular ou em razão do aumento da morte celular durante o desenvolvimento (DIAMOND e GORDON, 1997; MARCUSSEN et al., 1994). Nesse contexto, estudos sugerem o papel da apoptose no dano cerebral induzido pelo alcoolismo (FREUND, 1994), evidenciando a síndrome fetal alcoólica que induz padrão apoptótico de neurodegeneração em modelos de roedores (IKONOMIDOU et al., 2000; DIKRANIAN et al., 2005).

A exposição crônica ao etanol em ratos (SANNA et al., 2004; GREEN, 2004; WANG et al., 1999) produz ainda significativa diminuição de células nos estratos granuloso e molecular, além dos neurônios de Purkinje (GREEN, 2004; BAUER-MOFFETT e ALTMAN, 1977; BORGES e LEWIS, 1983; PHILLIPS et al., 1987; PIERCE et al., 1989) e altera a função motora controlada por essas regiões (MAYER e WEST, 2003).

6 Justificativa e objetivos

O alcoolismo é um problema de saúde pública mundial que traz conseqüências negativas para a saúde e qualidade de vida (NANCHAHAL et al., 2000; REHM et al., 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). O consumo por adultos pode ser potencializado ou não por experiências estressantes vividas na infância (DE BELLIS, 2002; ROMAN et al., 2004).

O etanol desencadeia alterações nas funções cerebelares (MAYER e WEST, 2003), as células de Purkinje e os demais neurônios cerebelares são sensíveis às suas variações na circulação sangüínea (GREEN, 2004; KOKSAL et al., 2005; MCGOEY et al., 2003; MIKI et al., 1999; NAPPER e WEST, 1995). Porém, estudos que correlacionem o estresse e consumo crônico de álcool no cerebelo são escassos. O presente trabalho propôs investigar e avaliar se a separação materna neonatal, aplicada em filhotes machos de ratos UChA e UChB, interage com a ingestão crônica de etanol sobre a morfometria das células dos estratos cerebelares.

Referências

II REFERÊNCIAS¹

AKIL, H.A.; MORANO, M.I. Stress. **Psychopharmacology**. 4.ed. ACNP, 2000. Ingress communications. Disponível em: <<http://www.acnp.org/g4>> Acesso em: 02 dez. 2000.

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.353-397, 1972a.

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: II. Phases the maturation of Purkinje cells and of molecular layer **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.399-463, 1972b.

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: III. Maturation of the components of the granular layer. **J. Comp. Neurol.**, v.145, p.465-513, 1972c.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4.ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994.

APFEL, M.I.; ESBERARD, C.A.; RODRIGUES, F.K.; BAHAMAD, F.M.; JR SILLERO, R.O. Stereologic study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in Wistar rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.60, p.258-263, 2002.

BAUER-MOFFETT, C.; ALTMAN, J. The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. **Brain Res.**, v.119, n.2, p.249-268, 1977.

BORGES, S.; LEWIS, P.D. The effect of ethanol on the cellular composition of the cerebellum. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v.9, n.1, p.53-60, 1983.

CHEN, W.J.; HARLE, L.K. Interactive effect of alcohol and nicotine on developing cerebellum: an investigation of the temporal pattern of alcohol and nicotine administration. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.29, p.437-442, 2005.

CHOCKKAN, V.; HAWKES, R. Functional and antigenic maps in the rat cerebellum: zebrin compartmentation and vibrissa receptive fields in lobule IXa. **J. Comp. Neurol.**, v.345, p.33-45, 1994.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. **JAMA**, v.267, p.118-126, 1992.

COSENZA, R.M. **Fundamentos de neuroanatomia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.83-87.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NR 6023**: informação e documentação - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of Journal indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

COSTA, L.G.; GUIZZETTI, M. Inhibition of muscarinic receptor - Induced proliferation of astroglial cells by ethanol: mechanisms and implications for the fetal alcohol syndrome. **Neurotoxicology**, v.102, p.1-7, 2002.

DE BELLIS, M.D. Developmental traumatology: a contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v.27, p.155-170, 2002.

DE BELLIS, M.D.; KESHAVAN, M.S.; CLARK, D.B.; CASEY, B.J.; GIEDD, J.N.; BORING, A.M.; FRUSTACI, K.; RYAN, N.D.A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part II: brain development. **Biol. Psychiatry**, v.45, p.1235-1236, 1999.

DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Rev.**, v.77, p.11-20, 1997.

DIKRANIAN, K.; QIN, Y.Q.; LABRUYERE, J.; NEMMERS, B.; OLNEY, J.W. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v.155, p.1-13, 2005.

DOLAN, R.J. A cognitive affective role for the cerebellum. **Brain**, v.121, p.545-546, 1998.

DUBE, S.R.; ANDA, R.F.; FELITTI, V.J.; CHAPMAN, D.P.; WILLIAMSON, D.F.; GILES, W.H.; Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. **JAMA**, v.286, p.3089-3096, 2001.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M. Alcohol dependence: provisional description of a clinical syndrome. **Br. Med. J.**, v.1, p.1058-1061, 1976.

EDWARDS, G.; GROSS, M.M.; KELLER, M.; MOSER, J. Alcohol-related problems in the disability perspective. **J. Stud. Alcohol**, v.37, p.1360-1382, 1976.

FREUND, G. Apoptosis and gene expression: perspectives on alcohol induced brain damage. **Alcohol**, v.11, p.385-387, 1994.

GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001. v.2, p.674-680.

GHEZ, C. The cerebellum. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (Eds.). **Principles of neural science**. New York: Elsevier, 2001. p.626-646.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; SPENCER, H.G.; BATESON, P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. **Proc. R. Soc. Biol.**, v.272, p.671-677, 2005.

GORDIS, E. Contributions of behavioral science to alcohol research: understanding who is at risk and why. **Exp. Clin. Psychopharmacol.**, v.8, n.3, p.264-270, 2000.

GONZALEZ, A.S.; RODRIGUES ECHANDIA, E.L.; CABRERA, R.; FOSCOLO, M.R. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. II. Effects on estrous cycle in females. **Physiol. Behav.**, v.56, p.591-595, 1994.

GOODLETT, C.R.; THOMAS, J.D.; WEST, J.R. Long-term deficits in cerebellar growth and rotarod performance of rats following "binge-like" alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.13, n.1, p.69-74, 1991.

GOODLETT, C.R.; PEARLMAN, A.D.; LUNDAHL, K.R. Binge neonatal alcohol intubations induce dose-dependent loss of Purkinje cells. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.20, p.285-292, 1998.

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

HALLEM, J.S.; THOMPSON, J.H.; GUNDAPPA-SULUR, G.; HAWKES, R.; BJAALIE, J.G.; BOWER, J.M. Spatial correspondence between tactile projection patterns and the distribution of the antigenic Purkinje cell markers anti-zebrin I and anti-zebrin II in the cerebellar folium crus HA of the rat. **Neuroscience**, v.93, p.1083-1094, 1999.

HASHIMOTO, M.; MIKOSHIBA, K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the birth date of Purkinje cells. **J. Neurosci.**, v.23, p.11342-11351, 2003.

HEIM, C.; NEMEROFF, C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biol. Psychiatry**, v.49, p.1023-1039, 2001.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci.**, v.20, n.2, p.78-84, 1997.

IKONOMIDOU, C.; BITTIGAU, P.; ISHIMARU, M.J.; WOZNIAK, D.F.; KOCH, C.; GENZ, K.; PRICE, M.T.; STEFOVSKA, V.; HORSTER, F.; TENKOVA, T.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J.W. Ethanol-induced neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. **Science**, v.287, p.1056-1060, 2000.

ITO, M. The modifiable neuronal network of the cerebellum. **Jpn. J. Physiol.**, v.34, p.781-792, 1984.

JACOB, T.; WATERMAN, B.; HEATH, A.; TRUE, W.; BUCHOLZ, K.K.; HABER, R.; SCHERRER, J.; FU, Q. Genetic and environmental effects on offspring alcoholism. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.60, p.1265-1272, 2003.

KENDLER, K.S.; KESSLER, R.C.; WALTERS, E.E.; MACLEAN, C.; NEALE, M.C.; HEATH, A.C.; EAVES, L.J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **Am. J. Psychiatry**, v.152, p.833-842, 1995.

KIERNAN, J.A. **Neuroanatomia Humana de Barr.** 7.ed. Barueri, SP: Malone, 2003. p.195-213.

KITSON, K.E. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present, and future (symposium). Regulation of the ethanol metabolism. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.20, n.82, p.92, 1996.

KOKSAL, M.; ILGAZ, C.; ERDOGAN, D.; OZOGUL, C.; TONG, E.K.; KALENDER, H. Ultrastructure of rat pup's Purkinje neurons whose mothers were exposed to ethanol during pregnancy and lactation. **Int. J. Neurosci.**, v.115, n.12, p.1669-1686, 2005.

LAFARGA, M.; BERCIANO, M.T.; BLANCO, M. Ectopic Purkinje cells in the cerebellum white matter of normal adult rodents: a Golgi study. **Acta Anat.**, v.127, p.53-58, 1986.

LEE, C.; KIM, D.W.; JEON, G.S.; ROH, E.J.; SEO, J.H.; WANG, K.C.; CHO, S.S. Cerebellar alterations induced by chronic hypoxia: an immunohistochemical study using a chick embryonic model. **Brain Res.**, v.901, p.271-276, 2001.

LEHMANN, J.; RUSSIG, H.; FELDON, J.; PRYCE, C.R. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.73, p.141-145, 2002.

LEVINE, S. The ontogeny of hypothalamic- pituitary- adrenal axis. The influence of maternal factors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.746, p.275-288, 1994.

LEVINE, S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.405, p.149-160, 2000.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiol. Behav.**, v.73, p.255-260, 2001.

LI, T.K.; LUMENG, L.; MCBRIDE, W.J., MURPHY, J.M. Rodent lines selected for factors affecting alcohol solution. **Alcohol Alcohol. Suppl.**, v.1, p.91-96, 1987.

LI, T.K.; SPANAGEL, R.; COLOMBO, G.; MCBRIDE, W.J.; PORRINO, L.J.; SUZUKI, T.; RODD-HENRICKS, Z.A. Alcohol reinforcement and voluntary ethanol consumption. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.25, n.5, p.117S-126S, 2001.

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

LIEBER, C.S.; DE CARLI, L.M. Hepatotoxicity of ethanol. **J. Hepathol.**, v.12, p.394-401, 1991.

MACHADO, A. **Neuroanatomía funcional**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.49-53, 215-216.

MANCINI, L.; BERTOSSI, M.; RONCALLI, L. Differentiation of cerebellar Purkinje neurons of the normal and chronically hypoxic chick embryo. **Boll. Soc. Ital. Sper.**, v.61, p.79-85, 1985.

MARCUSSEN, B.L.; GOODLETT, C.R.; MAHONEY, J.C.; WEST, J.R. Developing rat Purkinje cells are more vulnerable to alcohol-induced depletion during differentiation than during neurogenesis. **Alcohol**, v.11, p.147-156, 1994.

MARDONES, J. Es la predisposición genética al alcoholismo una perturbación del mecanismo de la saciedad de alcohol? **Pensam. Premios Nac. Cienc.**, p.19-34, 1993.

MAZARO, R. **Efeitos da estimulação neonatal e do estresse peripuberal sobre parâmetros reprodutivos de ratos machos púberes.** 2003. 89f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MAYER, S.E.; WEST, J. R. Alcohol and nutritional control treatments during neurogenesis in rat brain reduce total neuron number in locus ceruleus, but not in cerebellum or inferior olive. **Alcohol**, v.30, p.67-74, 2003.

McCLEARN, E.; RODGERS, D.A. Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v.54, p.116-119, 1961.

MCGOEY, T.N.; REYNOLDS, J.N.; BRIEN, J.F. Chronic prenatal ethanol exposure-induced decrease of guinea pig hippocampal CA1 pyramidal cell and cerebellar Purkinje cell density. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.81, p.476-484, 2003.

MEANEY, M.J.; BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; MCCORMICK, C.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V.; PLOTSKY, P. Individual differences in the hypothalamic- pituitary- adrenal stress response and hypothalamic CRF system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.697, p.70-75, 1993.

MEIJER, O.C. Understanding stress through the genome. **Stress**, v.9, n.2, p.61-67, 2006.

MIDDLETON, F.A.; STRICK, P.L. Cerebellar output channels. **Int. Rev. Neurobiol.**, v.41, p.61-82, 1997.

MIKI, T.; HARRIS, S.; WILCE, P.; TAKEUCHI, Y.; BEDI, K.S. The effect of the timing of ethanol exposure during early postnatal life on total number of Purkinje cells in rat cerebellum. **J. Anat.**, v.194, n.3, p.423-431, 1999.

MILLET, S.; BLOCH-GALLEGU, E.; SIMEONE, A.; ALVARADO-MALLART, R.M. The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts. **Development**, v.122, p.3785-3797, 1996.

NANCHAHAL, K.; ASHTON, W.D.; WOOD, D.A. Alcohol consumption, metabolic cardiovascular risk factors and hypertension in women. **Int. J. Epidemiol.**, v.29, n.1, p.57-64, 2000.

NAPPER, R.M.; WEST, J.R. Permanent neuronal cell loss in the cerebellum of rats exposed to continuous low blood alcohol levels during the brain growth spurt: a stereological investigation. **J. Comp. Neurol.**, v.362, n.2, p.283-292, 1995.

NETO, M.R.L. Saúde Mental. São Paulo. **Psiquiatr. Psicanál. online**, 2003. Disponível em: <<http://www.mentalhealth.med.br>>. Acesso em: 10 dez. 2003.

NEWPORT, J.D.; STOWED, Z.N.; NEMEROFF, C.B. Parental depression: animal models of an adverse life event. **Am. J. Psychiatry**, v.159, p.1265-1283, 2002.

OLIVEIRA, C.; FERREIRA, A.L. Effect of alcohol on the rat justaprostic pelvic ganglia and gonads. **Gegenbaurs Morphol. Jahrb.**, v.133, p.771-780, 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993. 351p.

ÖZER, E.; SARIOGLU, S.; GÜRE, A. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. **Clin. Neuropathol.**, v.19, p.121-125, 2000.

PENTNEY, R.J.; DLUGOS, C.A. Cerebellar Purkinje neurons with altered terminal dendritic segments are present in all lobules of the cerebella vermis of ageing, ethanol-treated F344 rats. **Alcohol Alcohol.**, v.1, p.35-43, 2000.

PHILLIPS, S.C.; HARPER, C.G.; KRIL, J. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. **Brain**, v.110, n.2, p.301-314, 1987.

PIERCE, D.R.; GOODLETT, C.R.; WEST, J.R. Differential neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. **Teratology**, v.40, n.2, p.113-126, 1989.

PIERCE, D.R.; WILLIAMS, D.K.; LIGHT, K.E. Purkinje cell vulnerability to developmental ethanol exposure in the rat cerebellum. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.23, n.10, p.1650-1659, 1999.

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Inc. Dev. Psychobiol.**, v.38, p.239-251, 2001.

PRYCE, C.R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.27, p.57-71, 2003.

RAPOPORT, M.; VAN REEKUM, R.; MAYBERG, H. The role of the cerebellum in cognition and behavior: a selective review. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v.12, n.2, p.193-198, 2000.

REHM, J.; GMEL, G.; SEMPOS, C.T.; TREVISAN, M. Alcohol-related morbidity and mortality. **Alcohol Res. Health**, v.27, p.39-51, 2003.

RHEE, S.H.; HEWITT, J.K.; YOUNG, S.E.; CORLEY, R.P.; CROWLEY, T.J.; STALLINGS, M.C. Genetic and environmental influences on substance initiation, use, and problem use in adolescents. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.60, n.12, p.1256-1264, 2003.

ROMAN, E.; PLOJ, K.; NYLANDER, I. Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. **Alcohol**, v.33, p.31-39, 2004.

SANNA, A.; CONGEDDU, E.; SABA, L.; PORCELLA, A.; MARCHESE, G.; RUIU, S.; CASTI, P.; SABA, P.; PANI, L. The cerebellar GABA alpha 6 subunit is differentially modulated by chronic ethanol exposure in normal (R100R) and mutated (Q100Q) SNP rats. **Brain Res.**, v.998, p.148-154, 2004.

SCHMAHMANN, J.D. An emerging concept: the cerebellar contribution to higher function. **Arch. Neurol.**, v.48, p.1178-1187, 1991.

SCHMIDT, M.; ENTHOVEN, L.; VAN WOEZIK, J.H.; LEVINE, S.; DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. **J. Neuroendocrinol.**, v.16, p.52-57, 2004.

SGAIER, S.K.; MILLET, S.; VILLANUEVA, M.P.; BERENSHTEYN, F.; SONG, C., JOYNER, A.L. Morphogenetic and cellular movements that shape the mouse cerebellum; insights from genetic fate mapping. **Neuron**, v.45, p.27-40, 2005.

SILLITOE, V.R.; JOYNER, A.L. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.23, p.549-577, 2007.

SILVA, B.P.F.; MELO-JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; PATU, V.J.R.M.; CAVALCANTI, C.B.L.; PONTESFILHO, N.T. Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. **Rev. Para. Med.**, v.20, n.1, p.7-14, 2006.

SMITH, M.A.; KIM, S.; VAN OERS, H.J.J.; AND LEVINE, S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. **Endocrinology**, v.138, p.4622-4628, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA - SBA. **Terminologia anatômica internacional**. São Paulo: Manole, 2001. p.248.

SOTELO, C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. **Prog. Neurobiol.**, v.72, p.295-339, 2004.

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

SPANAGEL, R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Res. Health**, v.24, n.2, p.124-31, 2000.

STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.A. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.821, p.1-18, 1997.

TEICHER, M.H. Wounds that time won't heal: the neurobiology of child abuse. **Cerebrum**, v.2, p.50-67, 2000.

VICTOR, M. Deficiency diseases of the nervous system secondary to alcoholism. **Postgrad. Med.**, v.50, p.75-79, 1971.

VOOGD, J. The human cerebellum. **J. Chem. Neuroanat.**, v.26, p.243-252, 2003.

VOOGD, J.; GLICKSTEIN, M. The anatomy of the cerebellum. **Trends Neurosci.**, v.21, p.370-375, 1998.

WANG, Y.; FREUND, R.K.; PALMER, M.R. Potentiation of ethanol effects in cerebellum by activation of endogenous noradrenergic inputs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.288, p.211-220, 1999.

WHITFIELD, J.B. Alcohol and gene interactions. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.43, n.5, p.480-487, 2005.

WINGATE, R.J.; HATTEN, M.E. The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. **Development**, v.26, p.4395-4404, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **About global alcohol database**. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/alcohol/alcohol_about_us.cfm?path=whosis,alcohol,alcohol_about&language=english>. Acesso em: 25 set. 2003.

WORST, T.J.; VRANA, K.E. Alcohol and gene expression in the central nervous system. **Alcohol**, v.40, n.1, p.63-75, 2005.

ZERVAS, M.; MILLET, S.; AHN, S.; JOYNER, A.L. Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere1. **Neuron**, v.43, p.345-357, 2004.

Artigo

III ARTIGO

Este trabalho deu origem ao artigo: **Há interação do etanol e da separação materna na morfometria da estrutura do córtex cerebelar de ratos UCh?** Após versão em inglês, será submetido para publicação no periódico *Cerebellum*.

Há interação do etanol e da separação materna na morfometria da estrutura do córtex cerebelar de ratos UCh?

Correspondence to Suelen Alves de Oliveira - Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP, Campus of Botucatu – District of Rubião Júnior S/N, Botucatu-SP, Brazil, CEP: 18618-000, PBO: 510 - ☎ (+5502114) 3811-6040 - FAX (+5502114) 3811-6361
e-mail: suelen@ibb.unesp.br

Resumo

Experiências traumáticas na infância estão associadas ao aumento do risco de abuso de álcool e de outras drogas na adolescência e na vida adulta. Crianças e adolescentes maltratados manifestam distúrbios do sistema biológico de resposta ao estresse. A exposição crônica a fatores estressantes aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Sendo o cerebelo local de ação do etanol, onde o consumo de forma abusiva altera o equilíbrio e a coordenação motora e que vários aspectos do alcoolismo podem ser frutos do estresse vivido precocemente, este trabalho buscou investigar e avaliar se a separação materna neonatal, aplicada em filhotes machos de ratos UChA e UChB, potencializa os efeitos tóxicos da ingestão crônica de álcool sobre a morfometria das células dos estratos cerebelares dos animais estudados. Para isso, utilizou-se modelo de alcoolismo experimental (ratos UChA e UChB) e de indução de hiper-reatividade do eixo HHA (Separação Materna). Foram realizadas análises microscópicas e morfométricas do córtex cerebelar. O estresse neonatal não alterou o padrão de consumo de etanol das linhagens UChA e UChB. Houve alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona. O córtex cerebelar dos animais UCh mostrou-se menor que no Wistar, sendo a SM fator protetor para atrofia desta região nos grupos SMUChA e SMCO. Os estratos granular e purkinjense mantiveram o padrão de alteração do córtex cerebelar, com a SM atenuando os efeitos do consumo crônico de etanol. Já a camada molecular encontrou-se maior nos animais UChB, onde após indução de hiper-reatividade do

eixo HHA ocorreu a atrofia deste grupo. Portanto, conclui-se que há interação do etanol e da SM sobre a estrutura do córtex cerebelar dos ratos UCh.

Palavras chaves: Cerebelo, Etanol, Separação Materna, Ratos UCh

Introdução

O estresse é um mecanismo de regulação da homeostase que visa, através de respostas fisiológicas e comportamentais, restabelecer o equilíbrio do organismo após a ameaça de um agente estressor. Seu mecanismo de ação envolve o sistema nervoso simpático, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e um complexo de circuitos neuronais que regulam a resposta autonômica, endócrina e comportamental. No entanto, o estresse crônico constitui um estado patológico, que favorece o desenvolvimento de psicopatologias e síndromes (1-4). Eventos estressantes durante as primeiras fases do desenvolvimento contribuem significativamente para tornar o adulto vulnerável a psicopatologias. Os cuidados paternos visam proteger a criança, porém a privação da presença dos pais, especialmente materna, pode romper com essa proteção (5-9). Traumas e negligências na infância exercem influências no comportamento emocional e riscos para o desenvolvimento de depressão, ansiedade e abuso de substâncias químicas (10,11,6).

A Separação Materna (SM) é um dos modelos experimentais para estudar o efeito permanente da relação materno-infantil durante o desenvolvimento pós-natal. Os filhotes são separados da mãe em intervalos superiores a uma hora, durante dias do desenvolvimento pós-natal, antes do desmame. Assim, a prole não só fica privada dos cuidados maternos durante o período, mas também sofre pela alteração do comportamento materno que persiste após a reunião mãe-filhotes. A SM resulta na hiperatividade do eixo HHA no adulto (12, 7, 13, 14, 4).

O eixo HHA está normalmente quiescente durante o período hiporresponsivo ao estresse do 4^o ao 14^o dia pós-natal, em ratos de uso laboratorial. Nesse período, o rato neonato demonstra, aparentemente, pouca ou nenhuma resposta adrenocortical a estímulos estressores, o que no adulto resultaria em aumento significativo das concentrações plasmáticas de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona (15-17). No entanto, a separação materna pode estimular o eixo HHA, possibilitando ao rato neonato responder a fatores estressantes brandos. Essa experiência ambiental precoce (separação materna) pode conduzir a alterações permanentes da resposta ao estresse e ser fator significativo de risco de psicopatologias na vida adulta (15,18, 19, 14).

O etanol, como estímulo estressor, é agente tóxico. Altera as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas afetando a embriogênese, a migração e a diferenciação celular. A exposição pré-natal a droga afeta o desenvolvimento de vários sistemas, incluindo o sistema músculo-esquelético, cardiovascular e o sistema nervoso central (SNC) (20). Esse, no entanto, é mais susceptível à toxicidade pelo álcool, lesando vários componentes celulares cruciais ao desenvolvimento cerebral, manifestado depois de longo tempo na prole, por malformações craniofaciais, alterações na morfologia e função do SNC (21, 20).

Embora o cerebelo constitua apenas 10% do volume total do encéfalo, contém mais da metade de todos os neurônios do SNC (22). Atua como coordenador da motricidade (23, 24), participa da cognição, desenvolvimento e alterações psíquicas (25), possuindo conexões via tálamo para muitas áreas encefálicas relevantes a esses processos (26, 27). Experimentos em ratos neonatais têm demonstrado que o cerebelo sofre limitação de crescimento e morte celular induzidos pelo etanol, além de deficiências cognitivas e de memória (28). Tem sido relatada a susceptibilidade dos neurônios de Purkinje a variações

agudas e crônicas nos níveis sanguíneos desta droga em diferentes idades (29-33). Sendo, os estratos granular e molecular também alterados pelos efeitos lesivos do álcool (34-38).

Dessa maneira, pelas alterações desencadeadas pelo etanol no cerebelo e tendo conhecimento que vários aspectos do alcoolismo podem ser frutos do estresse vivido precocemente, o objetivo do trabalho foi investigar e avaliar se a separação materna neonatal, aplicada em filhotes machos de ratos UChA e UChB, interage com a ingestão crônica de etanol sobre a morfometria das células dos estratos cerebelares.

Material e métodos

Animais

Utilizaram-se doze casais de matrizes para cada linhagem (UChA, UChB e Wistar). Os animais UChA e UChB foram provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP e os Wistar foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB, UNICAMP, Campinas-SP. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno medindo 40x30x15cm, com fundos sólidos, forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro) e temperatura (de 20 à 25°C), sendo fornecida água filtrada e ração (Nuvital[®]) *ad libitum*.

Indução ao estresse por separação materna

O dia do nascimento da ninhada foi estipulado como dia zero. As ninhadas foram padronizadas com oito filhotes tendo o maior número possível de machos. Os filhotes dos grupos experimentais foram separados da mãe diariamente, durante o Período Hiporresponsivo ao Estresse (SHRP, do inglês *stress-hyporesponsive period*), do 4º ao 14º dia de idade, sempre no mesmo horário. Durante a Separação Materna (SM), os filhotes foram

individualizados por quatro horas (240 minutos) em caixas com oito divisões de 15cm de largura, 9cm de profundidade e 15cm de altura e acomodados em sala anexa, com temperatura de 30°C e umidade superior a 50%, isolada ao máximo de ruídos externos. Os animais foram manejados por único pesquisador do início ao fim da experimentação. As mãos do investigador foram lavadas em água corrente, secas e esfregadas na maravalha de forro das caixas da ninhada para evitar que cheiros estranhos chegassem aos filhotes, evitando rejeição da mãe à prole. Posteriormente, os filhotes foram devolvidos ao cuidado materno, retirando-se a mãe de sua caixa antes de retornar a prole. Os filhotes dos grupos controles não foram separados da mãe, apenas receberam os cuidados necessários de manejo para criação de animais de laboratório.

Seleção dos animais bebedores de etanol

O desmame foi realizado aos 21 dias de idade, onde os filhotes machos foram alojados em caixas com o mínimo de dois e o máximo de quatro animais, evitando o estresse pelo isolamento social. Aos 50 dias de idade foram individualizados e receberam manejo regular para a espécie. Aos 65 dias de idade os animais receberam além de um frasco de água *ad libitum*, um contendo solução de etanol a 10%, sendo que ambos foram alternados periodicamente. Após 15 dias de avaliação da ingestão de solução de etanol a 10%, ocorreu a seleção e a padronização das linhagens UChA e UChB (39). Os ratos que apresentaram consumo médio menor que 2,0mL de etanol/100g de peso corpóreo/dia foram selecionados para linhagem UChA. Os animais que apresentaram consumo médio maior ou igual que 2,0mL de etanol/100g de peso corpóreo/dia foram selecionados para linhagem UChB. Do fim do período da seleção até a eutanásia (80 aos 120 dias de idade), o consumo de etanol foi medido a cada 7 dias. Dessa forma, foram estabelecidos seis grupos de ratos machos: UChA controle(CO) e UChA Separação Materna (SM), UChB CO e UChB SM, Wistar CO e Wistar

SM. Os ratos das linhagens UChA e UChB permaneceram 55 dias consecutivos ingerindo voluntariamente solução de etanol a 10%.

Após a seleção dos animais bebedores de etanol, quatorze animais permaneceram para cada tratamento. Na linhagem Wistar também foi selecionado, ao acaso, o mesmo número de animais. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Dosagem hormonal

A eutanásia foi realizada aos 120 dias de idade. Amostras de sangue de sete animais de cada grupo experimental foram coletadas entre 8 e 10 horas da manhã, após 12 horas de jejum, por decapitação, para análise das concentrações plasmáticas de corticosterona. As dosagens hormonais foram realizadas pelo método de rádio-imuno-ensaio de duplo anticorpo, de acordo com o protocolo do fabricante (NEN Life Science Products, USA).

Processamento do Material

Sete animais de cada grupo foram anestesiados com éter etílico e perfundidos com solução fixadora de Bouin através do ventrículo esquerdo do coração. Posteriormente os animais, foram submetidos à craniotomia e o encéfalo dissecado com ou sem auxílio do microscópio estereoscópico D.F. Vasconcelos. O material coletado foi preparado para análise microscópica e morfométrica:

a) Microscopia de luz: foram utilizados cinco animais por grupo. Os hemisférios cerebrais foram dissecados, desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e cortados com oito a dez micrometros de espessura.

Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE), examinados e fotografados por fotomicroscópio Olympus CX 31.

b) Morfometria: as variáveis massa corpórea(g), consumo de álcool(g/Kg/dia), altura do córtex cerebelar (μm), altura do estrato molecular(μm), granuloso (μm), purkinjense (μm) e áreas dos citoplasmas das células de Purkinje (μm^2), foram analisadas em cinco animais de cada grupo com mensurações aleatórias, em 15 lâminas diferentes para cada animal, em 3 cortes por lâmina com 5 medidas por cada corte. Foi utilizado o Sistema de Análise de Imagens KS-300 (Zeiss), microscópio AXIO phot 2 Zeiss conectado a microcomputador Pentium IV.

Análise estatística

O estudo estatístico das variáveis foi realizado através de técnica da análise de variância em experimentos inteiramente casualizados. A análise de variância foi complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (40), para contraste entre médias dos grupos de cada período com a análise de regressão polinomial, para o estudo do efeito do período de tratamento em cada um dos grupos. Os resultados dessas análises foram apresentados em gráficos e/ou figuras, e todas as conclusões realizadas em nível de 5% de significância (41).

Resultados

Consumo de etanol

Nos grupos UChA e UChB, o consumo de etanol diário, durante o período de tratamento, foi significativamente maior nos animais UChB comparado ao grupo UChA. O

consumo diário de etanol entre as condições experimentais (CO e SM) não apresentou diferença significativa (Tabela 1).

Peso corpóreo

O etanol diminui o peso corpóreo dos ratos UChB, sendo menores que os UChA e Wistar. A SM permitiu ganho de peso corpóreo, pois houve restabelecimento do peso no grupo UChB, não ocorrendo no CO e UChA. (Tabela 2).

Dosagem hormonal

A corticosterona plasmática dos ratos UCh foram menores que o Wistar, sendo significativamente menor no grupo UChA. A SM provocou aumento deste hormônio nos ratos UCh, com maior intensidade no grupo UChB. A resposta do grupo Wistar foi contrária (Tabela 3).

Altura do córtex cerebelar

A altura do córtex cerebelar dos ratos UCh foram menores que o Wistar, apesar destes valores não serem significativos (Figura 1). A SM provocou aumento altura do córtex cerebelar dos ratos UChA e Wistar (Tabela 4).

Altura do estrato granular

A altura do estrato granular do córtex cerebelar dos ratos UCh foram menores que o Wistar, sendo significativamente menor no grupo UChB. A Separação Materna nestes grupos causa algo semelhante, porém, nesses animais houve aumento dos valores, ainda que não significativos, da altura do estrato granular (Tabela 5).

Altura do estrato purkinjense

A altura do estrato purkinjense do córtex cerebelar dos ratos UCh foram menores que o Wistar, sendo significativamente menor no grupo UChA. A SM provocou aumento da altura deste estrato nos ratos UChA e UChB, com diferença significativa no grupo UChA (Tabela 6).

Altura do estrato molecular

A altura do estrato molecular do córtex cerebelar dos ratos UChB foram maiores que o Wistar e UChA apesar de não significativas. A SM provocou diminuição da altura do estrato molecular do córtex cerebelar dos ratos UChA e UChB comparados ao wistar, sendo significativa no grupo UChB (Tabela 7).

Área do citoplasma das células de Purkinje

A área do citoplasma das células de Purkinje do córtex cerebelar não apresentou diferença significativa entre os grupos. A SM provocou aumento da área do citoplasma do estrato de Purkinje do córtex cerebelar ratos UChA comparados ao UChB e Wistar (Tabela 8).

Discussão

As linhagens de ratos UChA e UChB são modelos de alcoolismo experimental com perfis de baixo (0,1-2 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia) e alto (4-7 gramas de etanol por quilograma de peso corpóreo por dia) consumo voluntário de etanol (42). A SM não alterou o perfil do consumo de etanol das linhagens alcoólicas. Esse resultado difere do observado em alguns estudos anteriores, onde eventos estressantes durante a

infância de roedores, como a SM, favoreceram o consumo e a dependência ao etanol (43-47). As respostas divergentes do consumo de etanol de ratos submetidos ao estresse na infância devem-se a variedade de protocolos experimentais adotados e a utilização de linhagens diferentes (48 *apud* 49). Ou ainda, ao respeitar o padrão adotado para a seleção das linhagens (50), pode-se ter excluído dos grupos experimentais animais que desenvolveram alta preferência de etanol devido ao desequilíbrio causado pela SM (51).

O peso corpóreo dos ratos UChB foram menores em relação aos ratos UChA e os Wistar. O etanol é alimento altamente energético, porém pobre em nutrientes. Seu consumo, substituindo alimentos necessários ao desenvolvimento orgânico, leva a perda de peso e a diminuição da disponibilidade de substâncias necessárias ao metabolismo, podendo causar desnutrição primária ou secundária, se decorrente de complicações no trato gastrointestinal (52,53). Porém, apesar da perda de peso, não foram identificados sinais de desnutrição nos animais UChB. A SM causou restabelecimento de peso nesse grupo. Bjorntorp e Rosmond (54) e Matos et al. (55) relataram que o excesso de massa corpórea ou obesidade e o estresse estão associados com a elevada concentração de Cortisol em humanos. De acordo com Kremer (49), o etanol ingerido na vida adulta é agente agressor que estimula a atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) na liberação da Corticosterona em ratos submetidos à SM. A incapacidade de metabolização do acetaldeído na ingestão crônica de etanol e seu acúmulo conduzem à toxicidade orgânica e estimulam a atividade do eixo HHA. Ratos expostos a ingestão crônica de etanol apresentam maior atividade do eixo HHA pela elevada síntese e liberação do CRH (fator liberador de corticotrofina), aumentando os níveis séricos de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e, conseqüentemente, de Corticosterona, embora graus de tolerância possam ser observados (56). Já a linhagem Wistar SM apresentou diminuição nas concentrações plasmáticas de Corticosterona em relação aos

controles. Segundo Martins (57), essa diminuição hormonal pode ser explicada pelo *feedback* nos reguladores do eixo HHA.

Houve tendência a atrofia do córtex cerebelar dos animais UChA e UChB em relação ao Wistar. Os efeitos tóxicos do etanol têm sido estudados no desenvolvimento de diversos sistemas orgânicos, sendo o sistema nervoso central (SNC) o de maior susceptibilidade (21,20). As estruturas cerebrais mais vulneráveis ao alcoolismo são o neocórtex, o sistema límbico e o cerebelo (58-60), onde a exposição pré-natal retarda o crescimento neural e leva a degeneração, contribuindo para déficits de memória e cognitivos (30). As razões da perda neural induzida pelo etanol permanecem indefinidas, porém acredita-se que ocorra devido à diminuição da proliferação celular, migração ou aumento da morte celular durante desenvolvimento (61,62). Sugere-se o papel da apoptose no dano cerebral induzido pelo etanol (63), o que explicaria a atrofia do córtex cerebelar, porém serão necessários estudos subsequentes com marcadores apoptóticos para confirmar esses achados. Rajgopal et al. (64) demonstraram que o cerebelo exibe alto nível de apoptose induzido pelo etanol comparado ao córtex cerebral e a morte neural ocorre por mecanismo que envolve a ativação da caspase 3. A SM interage com o etanol, uma vez que atenuou seus efeitos nos animais dos grupos UChA.

A atrofia do estrato granular observada está correlacionada com as diferenças de consumo de etanol entre as linhagens. Ratos UChB apresentaram os menores valores de altura do estrato granular, seguidos dos animais UChA e Wistar, demonstrando que a atrofia cerebelar é dose dependente. Há interação da SM e da ingestão crônica de etanol, pois os ratos UCh submetidos à SM apresentaram menor atrofia da camada granular.

As células de Purkinje são os elementos dominantes no processo de informação cerebelar (32) e mostram-se susceptíveis a variações agudas e crônicas do etanol no sangue (29). Trabalhos têm demonstrado a toxicidade do etanol nos neurônios de Purkinje

em diferentes concentrações (32,31), sendo as duas primeiras semanas pós-natal particularmente vulneráveis a sua aplicação (65-69). A perda neural induzida pelo etanol confirma a atrofia descrita no estrato Purkinjense nos grupos controles, demonstrando a interação do etanol com a SM sobre as células de Purkinje.

As áreas dos citoplasmas das células de Purkinje não apresentaram diferenças significativas entre os grupos mesmo existindo diminuição na altura do estrato Purkinjense. Sugerem-se duas prováveis hipóteses: (1) adaptação dos neurônios de Purkinje dos ratos UCh, buscando preservação da espécie. O abuso crônico de etanol produz adaptações bioquímicas no SNC com desenvolvimento de tolerância e dependência ao álcool (70). Os mecanismos envolvidos na adaptação neuronal são pouco compreendidos, porém parecem envolver alterações na estruturas e/ou funções da membrana celular (71). Ou (2) por ofertarmos o etanol com 65 dias de vida e mensurarmos as áreas dos citoplasmas das células de Purkinje na idade adulta, não identificamos alterações do corpo celular de Purkinje nos períodos embrionário e pós natal. Os neurônios de Purkinje de roedores são gerados em três dias de vida intra-uterina (E₁₁.E₁₃) (72,73). No período pós-natal ocorre rápido crescimento cerebral com pico de desenvolvimento por volta do 6º a 8º dias, onde há particular vulnerabilidade a influências ambientais (74,65). A administração de etanol durante o desenvolvimento e o período neonatal resulta em anormalidade (66-69) e déficits cerebelares (75,38,76-78, 69), sendo as células de Purkinje suscetíveis aos efeitos do álcool até o 9º dia pós-natal (31). Após este período mostram-se resistentes aos efeitos da ingestão de etanol e são capazes de sobreviver frente à substância (79).

O estrato molecular exibiu comportamento distinto das demais camadas do córtex cerebelar. Não foram evidenciadas alterações significativas na altura dos grupos UCh em relação ao Wistar, sugerindo-se a existência da adaptação da camada nas linhagens

alcoólicas. A SM provocou diminuição da altura do estrato molecular dos ratos UChA e UChB, comparado aos Wistar, sendo significativa no grupo UChB.

A SM apresentou correlação com a concentração plasmática de Corticosterona na vida adulta, sendo maiores em ratos submetidos à SM. Relata-se que ratos submetidos à SM durante as primeiras semanas de vida apresentam prolongado aumento dos níveis plasmáticos de Corticosterona a estímulos estressantes na vida adulta, atribuída à diminuição da eficiência da regulação do *feedback* da Corticosterona no hipotálamo, tornando o eixo HHA hiper-responsivo ao estresse (80-82).

A SM pode atenuar os efeitos prejudiciais encontrados pela ingestão crônica de etanol na altura do córtex cerebelar, do estrato granular, do molecular, do Purkinjense e na área do citoplasma das células de Purkinje, sendo freqüente nos ratos UChA. Em ratos Wistar naturalmente ocorrem variações no comportamento materno de lambido/limpar e amamentar, com o dorso arcado, seus filhotes (*Licking/grooming and archedback nursing* - LG-ABN) (83,84). De acordo com Martins (57), desde o início do período da SM, existiu diferenças no comportamento materno das linhagens UChA e UChB. As fêmeas UChA apresentaram, em sua totalidade (12 fêmeas), comportamento de intenso cuidado materno, denominado comportamento *alfa*, equivalente ao comportamento *High LG-ABN* (83,84). Já as fêmeas da linhagem UChB mostraram comportamento materno de baixo cuidado com a prole, denominado *beta*, equivalente ao comportamento *Low LG-ABN* (83,84). A literatura especializada descreve que os filhotes de mãe com alto índice de cuidados (*High LG-ABN*) possuem menor temor frente a situações novas e resposta branda do eixo HHA ao estresse comparados aos filhotes de mãe com baixo índice de cuidados maternos (*Low LG-ABN*) quando adultos (83,84). Ou seja, o comportamento materno é capaz de modular o desenvolvimento de respostas individuais do eixo HHA e influenciar as respostas comportamentais a agentes estressores no adulto (85,86,83,84).

Portanto, conclui-se que o etanol interage com a SM, atenuando ou potencializando alterações na estrutura do córtex cerebelar dos ratos UCh.

Referências

1. Kam EL, Coolen JCM, Ellenbroek BA, Cools AR. The effects of stress on alcohol consumption: mild acute and sub-chronic stressors differentially affect apomorphine susceptible and unsusceptible rats. *Life Sci.* 2005;76:1759-70.
2. Ricart-Jané D, Cejudo-Martín P, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero MD, Llobera M. Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *J Appl Physiol.* 2005;99(4):1343-51.
3. Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1083:77-110.
4. Macri S, Würbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm Behav.* 2006;50(5):667-80.
5. De Bellis MD, Keshavan MS, Clark DB, Giedd JN, Boring AM, Frustaci K, et al. Develop Traum. Part II: Brain development. *Biol Psychiatry.* 1999;45(10):1235-6.
6. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry.* 2001;49:1023-39.
7. Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry.* 2002;159(8):1265-83.
8. Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG, Bateson P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc R Soc B.* 2005;272:671-7.
9. Meijer OC. Understanding stress through the genome. *Stress.* 2006;9(2):61-7.
10. Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, et al. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry.* 1995;152:833-42.

11. Dube SR, Anda RF, Felitti VJ, Chapman DP, Williamson DF, Giles WH. Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *JAMA*. 2001;286:3089-96.
12. Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol*. 2001;38:239-51.
13. Pryce CR, Feldon J. Long-Term neurobehavioral impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27:57- 71.
14. Schmidt M, Enthoven L, Van Woezik JH, Levine S, De Kloet ER, Oitzl MS. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol*. 2004;16(1):52-7.
15. Smith MA, Kim SY, Van Oers HJ, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*. 1997;138:4622-8.
16. Zimmerberg B, Kim JH, Davidson AN, Rosenthal AJ. Early deprivation alters the vocalization behavior of neonates directing maternal attention in a rat model of child neglect. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1008:308-13.
17. Schmidt MV, Enthoven L, Van der Mark M, Levine S, De Kloet ER, Oitzl MS. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21:125-32.
18. Levine S. Primary social relationship influence the development of the hypothalamicpituitary- adrenal axis in the rat. *Physiol Behav*. 2001;73:255-60.
19. Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73:141-5.

20. Silva BPF, Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Patu VJRM, Cavalcanti CBL, Pontesfilho, NT. Efeitos da exposição perinatal à aguardente sobre o córtex cerebral de ratos. *Rev Para Med.* 2006;20(1):7-14.
21. Özer E, Sarioglu S, Güre A. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin Neuropathol.* 2000;19:121-5.
22. Ghez C. The cerebellum. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editors. *Principles of neural science.* New York: Elsevier; 2001. p.626-46.
23. Cosenza RM, editor. *Fundamentos de Neuroanatomia.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
24. Machado A, editor. *Neuroanatomia funcional.* 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
25. Rapoport M, Van Reekum R, Mayberg H. The role of the cerebellum in cognition and behavior: a selective review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2000;12(2):193-8.
26. Dolan RJ. A cognitive affective role for the cerebellum. *Brain.* 1998;121:545-6.
27. Middleton FA, Strick PL. Cerebellar output channels. *Int Rev Neurobiol.* 1997;41:61-82.
28. Goodlett CR, Thomas JD, West JR. Long-term deficits in cerebellar growth and rotarod performance of rats following "binge-like" alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt. *Neurotoxicol Teratol.* 1991;13(1):69-74.
29. Pentney RJ, Dlugos CA. Cerebellar Purkinje neurons with altered terminal dendritic segments are present in all lobules of the cerebella vermis of ageing, ethanol-treated F344 rats. *Alcohol Alcohol.* 2000;1:35-43.
30. Napper RM, West JR. Permanent neuronal cell loss in the cerebellum of rats exposed to continuous low blood alcohol levels during the brain growth spurt: a stereological investigation. *J Comp Neurol.* 1995;362(2):283-92.

31. Miki T, Harris S, Wilce P, Takeuchi Y, Bedi KS. The effect of the timing of ethanol exposure during early postnatal life on total number of Purkinje cells in rat cerebellum. *J Anat.*1999; 194(3):423-31.
32. Apfel MI, Esberard CA, Rodrigues FK, Bahamad FM, Sillero Junior RO. Stereologic study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in Wistar rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002;60:258-63.
33. Mcgoey TN, Reynolds JN, Brien JF. Chronic prenatal ethanol exposure-induced decrease of guinea pig hippocampal CA1 pyramidal cell and cerebellar Purkinje cell density. *Can J Physiol Pharmacol.*2003;81:476-84.
34. Green JT. The effects of ethanol on the developing cerebellum and eyeblink classical conditioning. *Cerebellum.* 2004;3:178-87.
35. Bauer-Moffett C, Altman J. The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. *Brain Res.*1997;119(2):249-68.
36. Borges S, Lewis PD. The effect of ethanol on the cellular composition of the cerebellum. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1983;9(1):53-60.
37. Phillips SC, Harper CG, Kril J. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. *Brain.*1987;110(2):301-14.
38. Pierce DR, Goodlett CR, West JR. Differential neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. *Teratology.*1989;40(2):113-26.
39. Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1983;5:171-8.
40. Zar JH, editor. *Biostatistical analysis.* 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.
41. Banzatto AD, Kronka SN. *Experimentação agrícola.* Jaboticabal: Funep; 1989.

42. Tampier L, Quintanilla ME, Mardones J. Acute tolerance, alcohol sensitivity and drinking pattern in the F2 generation of UChA and UChB rats. *J Stud Alcohol*. 2000;61(5):647-51.
43. Gustafsson L, Nylander I. Time-dependent alterations in ethanol intake in male Wistar rats exposed to short and prolonged daily maternal separation in a 4-bottle free-choice paradigm. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(12):2008-16.
44. Gilmer WS, McKinney WT. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J Affect Disord*. 2003;75:97-113.
45. Gordon HW. Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology*. 2002;27:115-26.
46. Langeland W, Draijer N, Van Den Brink W. Psychiatric comorbidity in treatment-seeking alcoholics: the role of childhood trauma and perceived parental dysfunction. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004;28:441- 7.
47. Nemeroff DC. Neurobiological consequences of childhood trauma. *J Clin Psychiatry*. 2004;65(1):18-28.
48. Roman E, Nylander I. The impact of emotional stress early in life on adult voluntary ethanol intake-results of maternal separation in rats. *Stress*. 2005;8:157-74.
49. Kremer R. Efeitos da separação maternal e do alcoolismo no testículo de ratos UChA e UChB (bebedores voluntários de etanol a 10%) [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2007.
50. Mardones, J. Es la predisposición genética al alcoholismo una perturbación del mecanismo de la saciedad de alcohol? *Pensam Premios Nac Cienc*. 1993;19-34.
51. Teixeira RG. Efeitos da separação maternal e do alcoolismo no epidídimo de ratos UCh (bebedor voluntário de etanol a 10%) [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2007.

52. Lieber CS. The metabolism of alcohol. *Sci Am.*1976;234:25-33.
53. Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991;15:573-92.
54. Bjorntorp P, Rosmond R. Obesity and cortisol. *Nutrition.* 2000;16(10):924-36.
55. Matos AFG, Moreira RO, Guedes RP. Aspectos neuroendócrinos da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(4):410-21.
56. Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health.* 2001;25:234-45.
57. Martins OA. Estresse, alcoolismo e vitamina e: avaliação de parâmetros bioquímicos e morfofisiologia prostática [tese]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2007.
58. Oscar-Berman M, Hutner N. Frontal lobe changes after chronic alcohol ingestion. In: Hunt WA, Nixon SJ, editors. *Alcohol-Induced brain damage.* Rockville, MD: NIAAA; 1993. p.121-56.
59. Oscar-Berman M, Marinkovic K. Alcoholism and the brain: An overview. *Alcohol Res Health.* 2003;27(2):125-33.
60. Sullivan EV. Compromised pontocerebellar and cerebellothalamocortical systems: Speculations on their contributions to cognitive and motor impairment in nonamnesic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(9):1409-19.
61. Diamond I, Gordon AS. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev.* 1997;77:11-20.
62. Marcussen BL, Goodlett CR, Mahoney JC, West JR. Developing rat Purkinje cells are more vulnerable to alcohol-induced depletion during differentiation than during neurogenesis. *Alcohol.* 1994;11:147-56.

63. Freund G. Apoptosis and gene expression: perspectives on alcohol induced brain damage. *Alcohol*. 1994;11:385-7.
64. Rajgopal Y, Chetty CS, Vemuri MC. Differential modulation of apoptosis-associated proteins by ethanol in rat cerebral cortex and cerebellum. *Eur J Pharmacol*. 2003;470:117-24.
65. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*. 1979;3/1:79-83.
66. Goodlett CR, Kelly SJ, West JR. Early postnatal alcohol exposure that produces high blood alcohol levels impairs development of spatial navigation learning. *Psychobiology*. 1987;15:64-74.
67. Kelly SJ, Pierce DR, West JR. Microcephaly and hyperactivity in adult rats can be induced by neonatal exposure to high blood alcohol concentration. *Exp Neurol*. 1987;96:580-93.
68. Meyer LS, Kotch LE, Riley EP. Neonatal ethanol exposure: functional alterations associated with cerebellar growth retardation. *Neurotoxicol Teratol*. 1990;12:15-22.
69. Pauli J, Wilce P, Bedi KS. Acute exposure to alcohol during early postnatal life causes a deficit in the total number of cerebellar Purkinje cells in the rat. *J Comp Neurol*. 1995;360:506-12.
70. Charness ME, Simon RP, Greenberg DA. Ethanol and the nervous system. *N Engl J Med*. 1989;321:442-54.
71. Miles MF, Diaz JE, DeGuzman VS. Mechanisms of neuronal adaptation to ethanol. *J Biol Chem*. 1991;266:2409-14.
72. Hashimoto M, Mikoshiba K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the birth date of Purkinje cells. *J Neurosci*. 2003;23:11342-51.

73. Sotelo C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol.*2004;72:295-339.
74. Dobbing J, Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child.*1973;48:757-67.
75. Phillips S, Cragg B. A change in susceptibility of rat cerebellar Purkinje cells to damage by alcohol during fetal, neonatal and adult life. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1982;8:441-54.
76. Bonthius DJ, West JR. Alcohol induced neuronal loss in developing rats : increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res.*1990;14:107-18.
77. Goodlett CR, Marcassen BL, West JR. A single day of alcohol exposure during the brain spurt induces microcephaly and cerebellar Purkinje cell loss. *Alcohol.*1990;7:107-14.
78. Hamre KM, West JR. The effects of the timing of ethanol exposure during the brain growth spurt on the number of cerebellar Purkinje and granule cell nuclear profiles. *Alcohol Clin Exp Res.*1993;17:610-22.
79. West JR, Hamre KM, Pierce DR. Delay in brain development induced by alcohol in artificially reared rat pups. *Alcohol.*1984;1:213-22.
80. Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16:187-97.
81. Hennessy MB. Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21:11-29.
82. Vázquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23:663-700.

83. Francis DD, Champagne FA, Liu D, Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. *Ann New York Acad Sci.* 1999a; 896:66-84.
84. Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science.* 1999b;286:1155-8.
85. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997;277(5332):1659-62.
86. Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:5335-40.

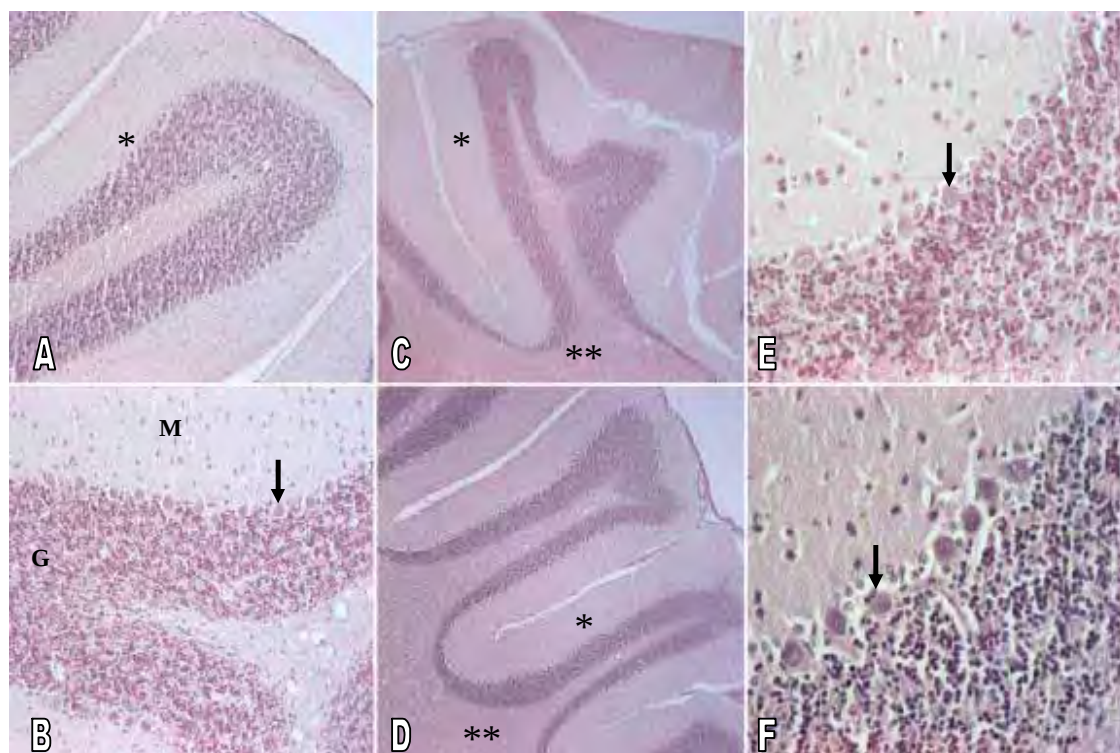


Figura 1. A-F. Fotomicrografias do cerebelo do rato. H.E. A. Grupo controle: folha cerebelar (*) 10X. B. Grupo controle estresse: observar estratos molecular (M), purkinjense (seta) e granular (G) 20X. C. Grupo UChA e D. Grupo UChA estresse: Mostra córtex (*) e corpo branco medular do cerebelo (**) 5X. E. Grupo UChB e F. Grupo UChB estresse: Evidencia estrato purkinjense (setas) 40X.

Tabela 1

Média $\pm$ erro-padrão do consumo de etanol (g/kg/dia) dos grupos (UChA e UChB) com 120 dias de idade segundo a condição experimental (CO e SM).

Grupos	Condição experimental	Consumo de etanol (g/Kg/dia)
UChA	CO	2,1 $\pm$ 0,2 a ¹ A ²
	SM	1,7 $\pm$ 0,2aA
UChB	CO	6,5 $\pm$ 0,5aB
	SM	7,0 $\pm$ 0,5aB

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental ($p < 0,05$).

Tabela 2

Média $\pm$ erro-padrão do peso corpóreo (g) dos ratos segundo os grupos (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (Controle (CO) e Separação materna (SM))

Grupos	Condição experimental	Peso corpóreo (g)
Wistar	CO	385,0 $\pm$ 9,9 a ¹ B ²
	SM	398,2 $\pm$ 8,9 aB
UChA	CO	371,1 $\pm$ 4,7 aB
	SM	364,0 $\pm$ 4,9 aA
UChB	CO	315,7 $\pm$ 10,2 aA
	SM	350,0 $\pm$ 13,2 bA

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental ($p < 0,05$).

Tabela 3

Média e desvio-padrão das concentrações plasmáticas do hormônio corticosterona (ng/ml) segundo grupo (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (CO e SM).

Grupos	Condição experimental	Corticosterona (ng/ml)
Wistar	CO	57,4±16,4b ¹ B ²
	SM	18,6±11,7aA
UChA	CO	10,0±4,4aA
	SM	28,6±13,5bA
UChB	CO	37,3±11,1aB
	SM	67,2±24,8bB

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental (p<0,05).

Tabela 4

Média e desvio-padrão da altura do córtex cerebelar (µm) segundo grupo (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (CO e SM).

Grupos	Condição experimental	Altura do córtex cerebelar (µm)
Wistar	CO	309,25±8,20 a ¹ A ²
	SM	329,61±11,37 bB
UChA	CO	303,80±14,62 aA
	SM	316,23±20,17aB
UChB	CO	304,88±7,66 aA
	SM	297,91±5,64 aA

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental (p<0,05).

Tabela 5

Média e desvio-padrão da altura do estrato granular (μm) do córtex cerebelar segundo o grupo (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (CO e SM).

Grupos	Condição experimental	Altura do estrato granular (μm)
Wistar	CO	115,29 $\pm$ 4,62 a ¹ B ²
	SM	117,23 $\pm$ 6,25 aB
UChA	CO	110,99 $\pm$ 8,52 aAB
	SM	111,68 $\pm$ 4,17 aAB
UChB	CO	106,81 $\pm$ 2,50 aA
	SM	109,20 $\pm$ 1,67 aA

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental

Tabela 6

Média e desvio-padrão da altura do estrato purkinjense (μm) segundo o grupo (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (CO e SM).

Grupos	Condição experimental	Altura do estrato purkinjense (μm)
Wistar	CO	15,22 $\pm$ 0,23 a ¹ B ²
	SM	15,34 $\pm$ 0,53 aA
UChA	CO	14,21 $\pm$ 0,43 aA
	SM	15,46 $\pm$ 0,36 bA
UChB	CO	14,96 $\pm$ 0,33 aB
	SM	15,31 $\pm$ 0,45 aA

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental ($p < 0,05$).

Tabela 7

Média e desvio-padrão da altura do estrato molecular (μm) segundo o grupo (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (CO e SM).

Grupos	Condição experimental	Altura do estrato molecular (μm)
Wistar	CO	183,91 $\pm$ 2,20 a ¹ A ²
	SM	197,69 $\pm$ 3,59 bB
UChA	CO	182,02 $\pm$ 8,88 aA
	SM	186,39 $\pm$ 21,14 aAB
UChB	CO	189,75 $\pm$ 11,07 aA
	SM	177,18 $\pm$ 6,94 aA

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental ($p < 0,05$).

Tabela 8

Média e desvio-padrão da área do citoplasma das células de Purkinje (μm^2) segundo o grupo (Wistar, UChA e UChB) e condição experimental (CO e SM)..

Grupos	Condição experimental	Área do citoplasma das células de Purkinje (μm^2)
Wistar	CO	175,94 $\pm$ 2,44 a ¹ A ²
	SM	175,26 $\pm$ 4,84 aAB
UChA	CO	174,09 $\pm$ 6,87 aA
	SM	181,21 $\pm$ 6,66 bB
UChB	CO	176,61 $\pm$ 3,60 aA
	SM	173,46 $\pm$ 1,59 aA

¹comparação da condição experimental (CO e SM) fixado o grupo.

²comparação entre os grupos fixada a condição experimental ($p < 0,05$).

Conclusões

IV CONCLUSÕES

Portanto, conclui-se que o etanol como agente agressor é capaz de interagir com os efeitos da SM, evidenciado nas concentrações plasmáticas de Corticosterona elevadas e na capacidade de atenuar ou potencializar os efeitos do etanol na estrutura do córtex cerebelar dos ratos UCh.