

JEAN PIERRE MENDES LIMA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETANOL
SOBRE A PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR
NAS EMINÊNCIAS GANGLIONARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jean Pierre Mendes Lima

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETANOL
SOBRE A PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NAS
EMINÊNCIAS GANGLIONARES

Dissertação de mestrado apresentada como
requisito para obtenção do grau de mestre em
Ciências Biológicas (Biofísica) – Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade
Federal do Rio de Janeiro

Orientadora: Patrícia Franca Gardino
Co-orientadora: Daniela Uziel Rozental

Laboratório de Neurobiologia da Retina
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Laboratório de Ontogênese e Regeneração Neural
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro - 2008

Lima, Jean Pierre Mendes.

Efeitos da exposição pré-natal ao etanol sobre a proliferação e morte celular nas eminências ganglionares/ Jean Pierre Mendes Lima. Rio de Janeiro: UFRJ, IBCCF^o, 2008.

xiii, 104p.

Orientadora: Patrícia Franca Gardino.

Co-orientador: Daniela Uziel Rozental

Dissertação de mestrado – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/ UFRJ.

Referências bibliográficas: p. 82-104.

1. Eminência ganglionar. 2. Exposição pré-natal ao etanol. 3. Ciclo celular. 4. Morte celular.
Dissertação de mestrado (Ciências Biológicas – Biofísica / IBCCF^o)

Jean Pierre Mendes Lima

Efeitos da exposição pré-natal ao etanol sobre a proliferação e morte celular nas eminências ganglionares

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2008.

Prof^a Patrícia Franca Gardino (Orientadora)
IBCCF^o-UFRJ

Prof^a Daniela Uziel Rozental (Co-Orientadora)
ICB-UFRJ

Prof. Alfred Sholl Franco
IBCCF^o-UFRJ

Prof^a Helena Maria Marcolla Araujo
ICB-UFRJ

Prof. Claudio Alberto Serfaty
Departamento de Neurobiologia-UFF

O presente trabalho foi realizado sob orientação da professora Patrícia Franca Gardino e da professora Daniela Uziel Rozental e desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da Retina do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF^o), e no Laboratório de Ontogênese e Regeneração Neural do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), ambos localizados na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa na minha vida está prestes a acabar e como tal faz-se necessário agradecer a todos que de algum modo participaram deste processo, não por obrigação, mas pela gratidão. Eu sou igual ao Batman, existem algumas coisas que não sei fazer muito bem, dentre elas agradecer. Por isso o grande número de citações.

À minha família que, apesar de nem sempre compreenderem a minha profissão, sempre me incentivaram a prosseguir nesta jornada, que nem eu mesmo sei qual será o destino.

À Daniela Uziel Rozental, o que dizer da Dani. Ela é mais do que apenas uma orientadora, ela é uma verdadeira mãe. Sabe a hora de brincar, mas sabe a hora de puxar as orelhas. Uma pessoa que, desde que conheci, admirei e continuo admirando. Eu sei que me estresso às vezes, mas eu sei que você sabe que grande parte do que nós dizemos é culpa do grau de estresse que todos nós estamos sendo submetidos. Espero continuar sendo seu orientando por muito tempo. Como Alphonse Brown Capone diz: "Uma vez em um negócio, no negócio para sempre".

À Edna Yamasaki e a Patrícia Gardino, embora não tenhamos passado muito tempo juntos, acredito que vocês duas foram pessoas importantes na minha vida. Muito obrigado por tudo.

Ao Renato Rozental, que além de ser uma pessoa especialíssima, sempre tem uma ótima história para contar. Foi ótimo te conhecer e muitos anos de convivência ainda estão por vir.

Ao Roberto Lent, o orientador de todos do laboratório. "Há homens que lutam um dia e são bons; Há outros que lutam um ano e são melhores. Há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida, e estes são imprescindíveis." (Bertold Brecht)

À Botu, ela foi nos meus experimentos meu terceiro e quarto braços. Se não fosse por ela certamente o erro padrão dos meus

resultados seria maior, pois não conseguiria dissecar trocentos embriões em minutos. Certamente na minha vida você também desempenha um papel fundamental, seja pelo lado psicóloga, pelo lado amiga, pelo lado cozinheira ou pelo lado hoteleira. “Seja qual for o seu sonho - comece. Ousadia tem genialidade, poder e magia.” Goethe.

Ao Noboro, que certamente sofreu comigo. Nunca vou esquecer daquele fatídico experimento que fizemos, e certamente você também não vai esquecer. Mas deu certo oras! Como eu não poderia deixar de fazer, lá vai uma frase que eu achei muito conveniente e dedico a você: “Dizem que os homens inteligente são os melhores maridos. Que Bobagem! Os homens inteligentes não se casam...” Barão do Itararé.

A todos os outros neuroplásticos e/ou ontogênicos. A vida acadêmica seria um martírio se consistisse apenas de trabalho. A convivência com todos faz a diferença. Cresci e continuo crescendo, grande parte devido a vocês.

Ao Adiel, a Ludmila e a Lena. Se não fosse o trabalho de vocês, certamente nosso trabalho seria quintuplicado.

Ao meu clan Forcekiller do jogo Priston Tale. Inúmeras foram as noites que passei jogando e inúmeras foram as vezes que morri no chat tentando explicar o que eu fazia na minha vida profissional. Nem só de artigos vive um mestrando, de vez em quando faz-se necessário uma cultura alternativa. Devo a vocês o fato de ainda permanecer no ranking brasileiro das melhores atalantas do servidor awell.

"Intelectual é aquele que diz uma coisa simples de um jeito complicado. Artista é quem diz uma coisa complicada de um jeito simples." Charles Bukowski

RESUMO

O desenvolvimento do sistema nervoso compreende uma série de eventos encadeados e interdependentes que se iniciam com a gênese das células nervosas e se prolongam até sua completa mielinização. O cérebro em desenvolvimento, tanto durante a fase embrionária quanto no período pós-natal imediato, é susceptível às influências de fatores externos ambientais, em particular, à intoxicação por álcool. Em casos de exposição pré-natal ao etanol, mudanças estruturais e metabólicas ocorrem e levam a alterações funcionais que podem alterar/reduzir a sobrevivência de indivíduos acometidos. Neste estudo investigamos quais são os efeitos provocados pelo etanol nas etapas de gênese e morte de células neurais *in vivo* nas eminências ganglionares, uma região do telencéfalo ventral que dá origem a maioria dos interneurônios corticais GABAérgicos. Para isso utilizamos camundongos aos 14 dias embrionários, cujas mães receberam etanol (2g/Kg) por via oral durante 4 dias e analisamos a dinâmica de seu ciclo celular pela marcação com BrdU e seu padrão de morte celular pela marcação com vermelho neutro. Todas as análises foram feitas uma hora após a última gavagem e a dosagem de etanol sérica foi de 110mg/dL. Nossos resultados demonstram que o etanol é capaz de alterar o ciclo celular nas eminências ganglionares, modificando o número de células na fase S e a velocidade do ciclo celular, além de aumentar a morte celular. Estas alterações variaram de acordo com a região ântero-posterior estudada dentro da eminência ganglionar e afeta de forma diferente as eminências medial e lateral. Sugerimos que o uso de etanol, mesmo que por curto período durante a gestação, pode alterar a gênese de populações celulares durante o período analisado.

ABSTRACT

The development of the nervous system begins with cell generation at the proliferative zones and extends till the complete myelination. The developing brain during embryonic and early postnatal stages is susceptible to environmental factors, particularly to ethanol abuse. Pré-natal exposure to ethanol leads to structural, metabolic and functional impairment that can impact on the survival of exposed subject. In this study we investigate the effect of ethanol on the genesis and the cell death at the ganglionic eminences *in vivo*. Ganglionic eminences are part of the basal telencephalon and originate the majority of GABAergic interneurons that populate the cerebral cortex and other telencephalic structures in rodents. We used 14 days old embryos of mice whose mothers received ethanol by gavages (2g/Kg) for 4 days prior to sacrifice. We analyzed the cell cycle dynamic by injecting BrdU, 30 minutes after the last gavage, and immunostaining for BrdU. The rate of cell death was analyzed by neutral red staining. We analysed the embryos 60 minutes after the last gavage, and the dosage of the ethanol in the blood was 110mg/dl. Our results show that ethanol alters the cell cycle at the ganglionic eminences, modifying the mechanisms of cell cycle length control and the number of cells in S phase. In addition, we found an increased number of picnotic nuclei after ethanol treatment. This pattern of modification was not homogeneous throughout the anteroposterior axis of the developing ganglionic eminences and varied also between the lateral and medial eminences. Our results support the concept that even the short-term use of ethanol during pregnancy may impact on fetal neurogenesis.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações e Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1 Introdução	14
1.1 Desenvolvimento do sistema nervoso central	14
1.2 Síndrome alcoólica fetal (SAF)	19
1.3 Alterações anatômicas do sistema nervoso humano relacionadas ao etanol.....	21
1.4 Influência do etanol na proliferação dos precursores neuronais	22
1.5 Influência do etanol na migração neuronal.....	27
1.6 Influência do etanol na morte celular	31
2 Objetivos	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 Materiais e métodos	36
3.1 Animais	36
3.2 Tratamento.....	36
3.3 Injeção de BrdU	37
3.4 Preparação do tecido.....	37
3.5 Dosagem de etanol no sangue	38
3.6 Imunohistoquímica para BrdU	38
3.7 Coloração com vermelho neutro.....	39
3.8 Coloração com DAPI	39
3.9 Coleta e análise dos dados.....	40
4 Resultados	50
4.1 Efeitos do etanol sobre a espessura das eminências ganglionares	50
4.2 Efeitos do etanol sobre o ciclo celular nas eminências ganglionares	52
4.3 Efeitos do etanol sobre a morte celular nas eminências ganglionares	61
5 Discussão	63
5.1 Cinética do ciclo celular e dinâmica da proliferação celular no SNC	64
5.2 Cinética do ciclo celular e os efeitos provocados pelo etanol	68
5.3 Aceleração do ciclo celular ou aumento no número de células ciclando?	70
5.4 Morte Celular durante o desenvolvimento do SNC	76
6 Conclusões	80
7 Referências	82

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura		Página
1	Diagrama dos compartimentos citoarquitetônicos e citocinéticos no encéfalo de mamíferos.....	15
2	O etanol altera a migração cortical de diversas maneiras.....	29
3	Variações rostro-caudal dos marcadores anatômicos das eminências ganglionares.....	41
4	Técnica de medida do tamanho das eminências ganglionares e das zonas proliferativas.....	42
5	Sítio de análise nas eminências ganglionares.....	45
6	Subdivisão das eminências em faixas e estimativa do índice de marcação.....	46
7	Estimativa da zona de fase S e delimitação das zonas proliferativas.....	47
8	Coloração com vermelho neutro e análise de núcleos condensados.....	48
9	Medida do tamanho da zona proliferativa (ZP), zona do manto (ZM) e da eminência ganglionar (total).....	51
10	Análise da marcação por BrdU na EGM.....	55
11	Análise da marcação por BrdU na EGL.....	58
12	Análise da marcação por BrdU na EGC.....	60
13	Contagem de núcleos condensados nas eminências ganglionares.....	62
14	Alterações no ciclo celular provocadas pelo etanol nos diferentes níveis rostro-caudais.....	73

Tabela		Página
1	Estimativa hipotética da zona ventricular (ZV) e da zona subventricular nos diferentes níveis rostro-caudais das eminências ganglionares.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

- [³H]dT: [³H]timidina
BO: bulbo olfatório
BrdU: bromo-deoxiuridina
BSA: albumina do soro bovino, do inglês *bovine serum albumin*
CTR: fetos não expostos ao etanol
CTX: neocórtex
DAB: diaminobenzidina
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DEAF: desordens de espectro alcoólico fetal
EGC: eminência ganglionar caudal
EGL: eminência ganglionar lateral
EGM: eminência ganglionar medial
ETOH: fetos expostos ao etanol
EVP: epitélio ventricular pseudoestratificado
FISH: hibridização interfásica *in situ* fluorescente, do inglês *fluorescent in situ hybridization*
IM: índice de marcação
PBS: Tampão fosfato em salina
PC: placa cortical
PPS: população proliferativa secundária
Q: probabilidade de que novas células filhas encerrem o ciclo celular
SAF: Síndrome alcoólica fetal
SNC: sistema nervoso central
SP: subplaca
VL: ventrículo lateral
ZI: zona intermediária
ZM: zona marginal
ZP: zona proliferativa
ZSV: zona subventricular
ZV: zona ventricular

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O desenvolvimento do encéfalo inicia-se durante a embriogênese e em diversos animais, como por exemplo, nos roedores, e continua durante a vida pós-natal. Ao nível celular, o desenvolvimento do SNC pode ser dividido em cinco grandes etapas: (1) gênese das células nervosas; (2) migração; (3) diferenciação morfofuncional (expressão de neurotransmissores e emissão de prolongamentos); (4) busca dos alvos para o estabelecimento de conexões; e (5) fenômenos regressivos. Cada uma dessas etapas ontogênicas envolve uma intrincada coreografia de processos moleculares e celulares que não seguem uma seqüência rígida.

A proliferação celular é o passo inicial no processo de desenvolvimento do SNC. As células do SNC são geradas a partir de células precursoras que revestem a superfície ventricular do tubo neural. As células precursoras são organizadas como um epitélio colunar pseudoestratificado, normalmente referido como epitélio ventricular pseudoestratificado (BOULDER COMMITTEE, 1970; TAKAHASHI *et al*, 1993). A região do tubo neural do sistema nervoso embrionário que contém o epitélio ventricular pseudoestratificado é chamada de zona ventricular (ZV), uma região definida histologicamente que se localiza ao redor dos ventrículos. A maior parte das células na ZV é bipolar e ocupa toda a extensão da superfície ventricular (interna) e pial (externa) durante os estágios iniciais de desenvolvimento. No entanto, com a progressão do desenvolvimento, outras camadas adjacentes a ela vão surgindo (Figura 1A).

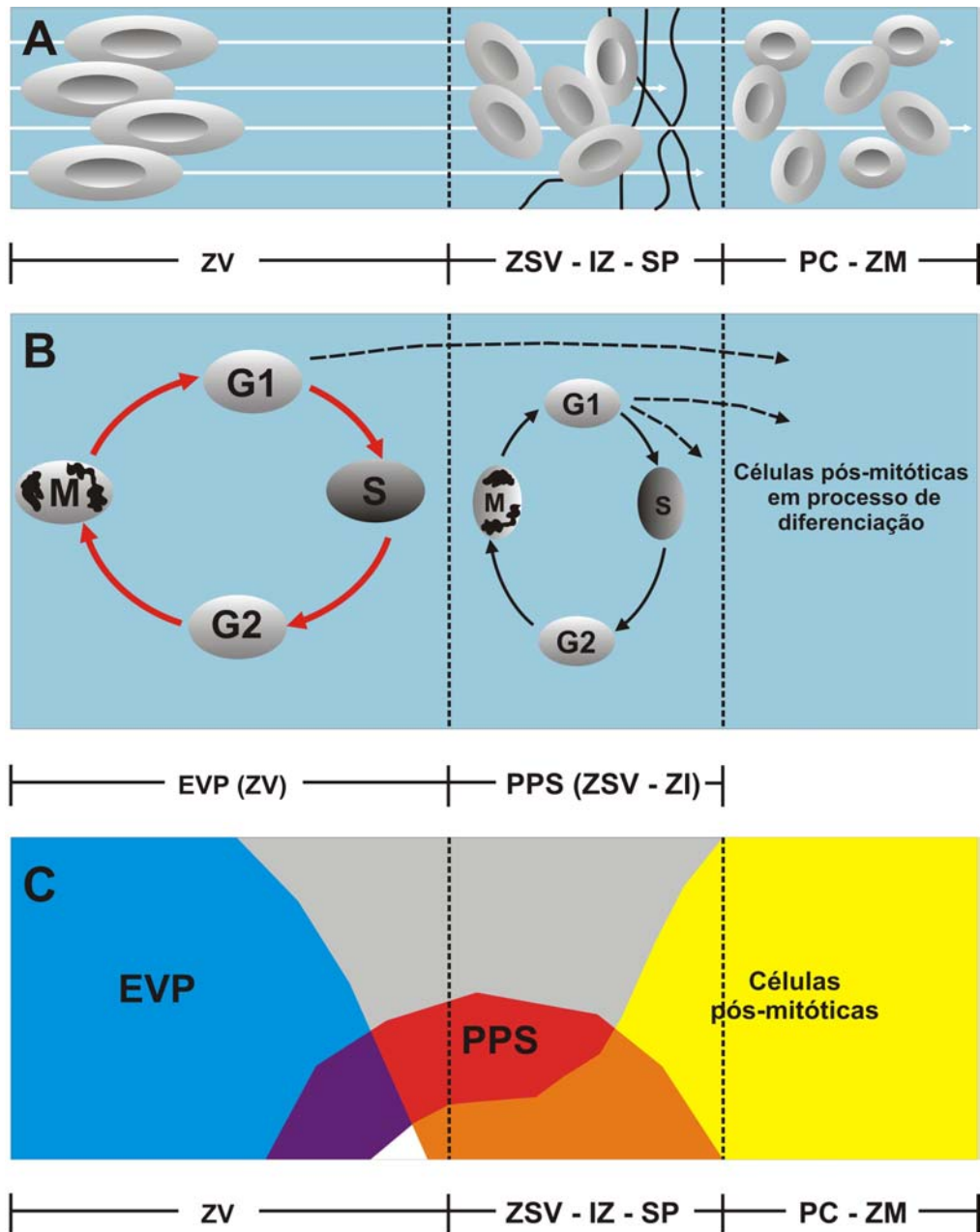


Figura 1: Diagrama dos compartimentos citoarquitetônicos e citocinéticos no encéfalo de mamíferos. A superfície ventricular se localiza no canto esquerdo e a superfície pial se localiza à direita. (A) Quatro compartimentos citoarquitetônicos podem ser reconhecidos com base em critérios citológicos (BOULDER COMMITTEE, 1970; SMART, 1976): a zona ventricular (ZV), a zona subventricular (ZSV), a zona intermediária (ZI) e três campos de diferenciação – a subplaca (SP), a placa cortical (PC) e a zona marginal (ZM). As linhas tracejadas indicam uma borda aproximada entre diferentes compartimentos. (B) As células precursoras podem ser classificadas em dois grupos com base em seu padrão migratório nuclear intercinético. As células do epitélio ventricular pseudoestratificado (EVP) apresentam migração nuclear intercinética (setas vermelhas) enquanto as células da população proliferativa secundária (PPS) não apresentam migração nuclear intercinética (setas pretas). As células do epitélio ventricular pseudoestratificado que deixam o ciclo celular saem da ZV, migram através da ZSV e ZI (flecha tracejada) e estabelecem-se na PC/ ZM. As células da PPS que deixam o ciclo celular também migram para a PC/ ZM (setas tracejadas). (C) A distribuição espacial das células do epitélio ventricular pseudoestratificado, PPS e PC/ ZM é ilustrada para demonstrar a sobreposição entre as populações proliferativas e pós-mitóticas. Como demonstrado, os compartimentos citoarquitetônicos e citocinéticos apresentam uma considerável sobreposição no sistema nervoso em desenvolvimento (modificado de Miller, 2006).

As células da ZV passam por um processo chamado migração nuclear intercinética (SIDMAN *et al*, 1959; FUJITA, 1960; SAUER, 1936). Desse modo, os núcleos do epitélio ventricular pseudoestratificado são distribuídos na ZV de acordo com as fases do ciclo celular (Figura 1B). Os núcleos em mitose são localizados na borda ventricular, enquanto os núcleos na fase de síntese de DNA ou fase S estão em localizações abventriculares. Núcleos das células passando por G1 e G2 estão localizados em distâncias intermediárias entre esses dois pólos.

Nos estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário, várias regiões se interpõem entre a ZV e a superfície pial. Desse modo, subdivisões citoarquitetônicas e populações precursoras adicionais emergem. Uma subpopulação de células precursoras que emerge é chamada de população proliferativa secundária, cuja subdivisão citoarquitetônica é chamada de zona subventricular (ZSV) (BOULDER COMMITTEE, 1970). As células da ZSV não são organizadas em um epitélio e não apresentam migração nuclear intercinética (RAKIC *et al*, 1974) (Figura 1B). Em estruturas laminares, como o córtex cerebral, no mesmo período de tempo em que a ZSV emerge, uma pré-placa aparece entre a ZSV e a superfície pial, oriunda das células que deixam o ciclo celular nas regiões proliferativas e migram radialmente (BOULDER COMMITTEE, 1970; MARIN-PADILLA, 1983). Em seguida a pré-placa se divide em uma zona marginal (ZM), subplaca e entre as duas emerge a placa cortical (PC), constituída por sucessivas ondas de migração radial de células pós-mitóticas. Essas três zonas são áreas que contém células pós-mitóticas e células em processo de diferenciação geradas na ZV e ZSV (Figura 1A).

Ainda no córtex cerebral, uma outra subdivisão arquitetônica chamada zona intermediária (ZI) se desenvolve. A ZI se localiza entre a ZSV e a subplaca e contém axônios em crescimento, neurônios pós-mitóticos migrando e células de linhagem

glial. Outras áreas, como as eminências ganglionares, não apresentam PC, subplaca e ZI, apresentando uma extensa zona do manto, consistindo de células pós-mitóticas se diferenciando. Note que a ZV, ZSV, PC e ZM são subdivisões citoarquitetônicas do sistema nervoso enquanto o epitélio ventricular pseudoestratificado e a população proliferativa secundária são subdivisões citocinéticas das populações precursoras. As subdivisões citoarquitetônicas e citocinéticas se sobrepõem extensivamente, como demonstrado na Figura 1C.

A migração neuronal é um processo fundamental no desenvolvimento do SNC, devido as células neuronais e não-neuronais serem geradas em sítios que normalmente diferem dos seus destinos finais. Desse modo, a maior parte dos neurônios migram a partir dos seus sítios de última divisão mitótica, próximo ao ventrículo, em direção a superfície externa do SNC onde eles se integram nos circuitos cerebrais específicos. Dois tipos principais de neurônios dão origem às camadas neocorticais no desenvolvimento normal: (1) neurônios de projeção, glutamatérgicos, originados principalmente em zonas proliferativas telencefálicas dorsais (RAKIC, 1972; LETINIC *et al.*, 2002), e (2) interneurônios GABAérgicos, derivados de zonas proliferativas telencefálicas ventrais (eminências ganglionares) (ANDERSON *et al.*, 1997; MARÍN e RUBENSTEIN, 2003 e 2001, Ang *et al* 2003). Devido os tipos neuronais serem gerados em locais distintos, eles apresentam diferentes formas de migração celular, detalhadas a seguir.

No telencéfalo dorsal, a migração radial é reconhecida como um mecanismo primário pelo qual os neurônios em desenvolvimento alcançam suas posições finais (ANGEVINE e SIDMAN, 1961; MARÍN-PADILLA, 1971; RAKIC, 1974; NADARAJAH *et al.*, 2001). Nos estágios mais iniciais do desenvolvimento cortical ela é feita pelos neurônios imaturos através do deslocamento do soma em direção a zona marginal

(NADARAJAH *et al*, 2001; MOREST, 1970). Com o espessamento do córtex, a migração dos neurônios imaturos torna-se dependente de interações dos neurônios migrantes com processos de glia radial (RAKIC, 1971; RAKIC *et al*, 1972; RAKIC *et al*, 1974; EDMONSON e HATTEN, 1987, MISSON *et al* 1991). As células que adotam a locomoção guiada pelos feixes de glia radial possuem um processo líder curto e apresentam um padrão de locomoção saltatória que é curta com movimentos progressivos rápidos, seguida por fases estacionárias relativamente longas (NADARAJAH *et al*, 2001).

Um segundo tipo de migração celular, a migração tangencial, é feita pelas células geradas no telencéfalo ventral em uma estrutura transitória chamada eminência ganglionar. As eminências ganglionares são fonte de origem dos interneurônios corticais, e dos interneurônios de outras estruturas prosencefálicas como o corpo estriado e o bulbo olfatório (WICHTERLE *et al.*, 2001; CORBIN *et al.*, 2000; MARÍN e RUBENSTEIN, 2001, 2003; YUN *et al.*, 2001). Além disso, as eminências ganglionares originam os núcleos da base (HAMASAKI *et al*, 2003). A migração celular tangencial ocorre em múltiplas regiões do SNC e contribui para a dispersão celular de células relacionadas clonalmente (O'ROUKE *et al*, 1992; O'ROUKE *et al*, 1995; CORBIN *et al*, 2001). Essas células seguem diversas rotas em busca de seus destinos finais que variam tanto espacialmente quanto temporalmente (MARÍN e RUBENSTEIN, 2001). Durante o período de migração tangencial (entre E12 e E19 em camundongos; E1 = primeiro dia embrionário) as células deixam as regiões proliferativas das eminências ganglionares e começam a expressar GABA bem como sua enzima de síntese, a GAD 67. Estes são observados na zona do manto, mas não nas zonas proliferativas (DENAXA *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2003).

Em seguida a proliferação e migração, outros fenômenos progressivos ocorrem: diferenciação e sinaptogênese. A etapa final de formação do sistema nervoso consiste de fenômenos regressivos, onde conexões são eliminadas, ocorre regressão neurítica e eliminação de células. Estas etapas regressivas consistem numa forma de refinamento, que é intimamente influenciado pelo início da atividade elétrica. A morte neuronal é um processo natural no sistema nervoso em desenvolvimento (JACOBSON, 1991; MARTIN, 2001; LOSSI e MERIGHI, 2003). Ela afeta neurônios proliferando (BLASCHKE *et al*, 1996, 1998; THOMAIDOU *et al*, 1997), neurônios pós-mitóticos (BLASCHKE *et al*, 1996, MILLER, 1995c) e neurônios pós-migratórios (HAMBURGER e LEVI-MONTALCINI, 1949; WILLIAMS e SMITH, 1993; MILLER, 1995c). A incidência de morte celular no sistema nervoso pode variar de 20 a 80%, dependendo da fase do desenvolvimento e da espécie estudada. Os fatores que contribuem para a incidência de morte celular são a localização dos neurônios vulneráveis e o estado de maturação desses neurônios. Um exemplo é o córtex cerebral, no qual a incidência de morte celular é maior nas camadas mais profundas e nas camadas mais superficiais (MILLER, 1995c).

1.2 SÍNDROME ALCOÓLICA FETAL (SAF)

O conceito de que o etanol afeta o desenvolvimento do encéfalo de mamíferos ficou conhecido em 1973 através de publicações feitas por Jones e Smith nos EUA (JONES E SMITH, 1973; JONES *et al*, 1973). Esses não foram os primeiros relatos que identificaram os efeitos da exposição fetal ao etanol. Lemoine, na França (LEMOINE *et al*, 1968), e Ulleland, nos EUA (ULLELAND, 1972), já haviam descrito características da SAF, embora se acredite que os primeiros relatos

que associam o consumo de álcool durante a gravidez e os efeitos deletérios na progênie advêm da mitologia grega e romana e da Bíblia (para uma revisão ABEL, 1984).

Ocorrendo em 30-50% dos conceptos de mãe alcoólatras (HANSON, 1976) a incidência da SAF varia com a população estudada (LARROQUE, 1992), sendo estimada em 1-3:1000 nascidos vivos nos EUA (LITTLE, 1990), 1:600 na Suécia (AUTTI-RÄMÖ e GRANSTRÖM, 1991) e 1:50 em algumas aldeias indígenas americanas (ROSSET, 1981). Acredita-se que a SAF ocorre em 0,1% de todos os nascidos vivos na população mundial sendo a primeira causa de retardo mental nos EUA (SOKOL *et al*, 2003). Não há estatísticas confiáveis sobre incidência de SAF no Brasil (GREGHI, 1990).

Os critérios mínimos para o diagnóstico da SAF são: retardo de crescimento pré ou pós-natal; envolvimento do sistema nervoso, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e alteração do QI e do comportamento; dismorfismo facial, podendo apresentar microcefalia, microftalmia e/ou fissura palpebral pequena, filtro nasal hipoplásico com lábio superior fino e hipoplasia de maxilar (AUTTI-RÄMÖ, 1992; LEONARD, 1991). Estes critérios foram estabelecidos pela "Research Society on Alcoholism" após revisão de sinais e sintomas apresentados por 245 pacientes com SAF (ROSSET, 1981). Os efeitos do álcool no desenvolvimento estão relacionados com o período em que ocorreu a ingesta alcoólica, com os níveis de álcool circulantes e se o efeito decorreu de uma ingestão crônica ou aguda. O nível sérico mínimo de etanol que resulta em SAF ainda não foi estabelecido, no entanto somente o uso crônico leva à síndrome (CLARREN *et al*, 1978; DAVIS *et al*, 1982; GALEA *et al*, 1989; HANSON *et al*, 1978; HOYSETH *et al*, 1989; LEONARD *et al*, 1991; SAMPSON *et al*, 2000).

1.3 ALTERAÇÕES ANATÔMICAS DO SISTEMA NERVOSO HUMANO RELACIONADAS AO ETANOL

Estudos em humanos e em modelos animais sugerem que o etanol é um teratôgeno que provoca efeitos tóxicos no encéfalo. Diversos grupos de estudo usando coortes de pacientes com SAF têm reportado os efeitos da exposição pré-natal ao etanol no encéfalo de adolescentes e adultos. A maior parte desses estudos usou imageamento por ressonância magnética e se focaram na morfologia das estruturas encefálicas (RILEY *et al*, 1995; AUTTI-RAMO *et al*; 2002; ARCHIBALD *et al*; 2001). Nestes estudos, a microcefalia foi o achado mais consistente nos pacientes portando a SAF, os quais possuíram uma redução global do volume encefálico (RILEY *et al*, 1995; ARCHIBALD *et al*, 2001; SOWELL *et al*, 2001a e 2001b; BHATARA *et al*, 2002). De maneira mais específica, reduções relativas na substância branca têm sido observadas no corpo caloso e subjacente ao lobo parietal (RIIKONEN *et al*, 1999; ARCHIBALD *et al*, 2001; SOWELL *et al*, 2001b) em pacientes com SAF. Além disso, agenesia do corpo caloso completa ou parcial também são encontradas (RILEY *et al*, 1995; JOHNSON *et al*, 1996; SWAYZE *et al*, 1997; RIIKONEN *et al*, 1999; CLACK *et al*, 2000), sugerindo que a exposição pré-natal ao etanol pode gerar essa condição (JERET *et al*, 1986).

Diversos estudos de imageamento por ressonância magnética descrevem hipoplasia cerebelar em indivíduos expostos pré-natalmente ao etanol com ou sem o quadro característico de SAF (MATTSON *et al*, 1996; RIIKONEN *et al*, 1999; ARCHIBALD *et al*; 2001; AUTTI-RAMO *et al*; 2002). Tanto a substância cinzenta quanto a branca são reduzidas em indivíduos expostos ao etanol (ARCHIBALD *et al*, 2001), particularmente no verme anterior (lóbulos I-V) (SOWELL *et al*, 1996). Esses

achados são corroborados por estudos em animais (GOODLETT e LUNDAHL, 1996; GOODLETT *et al*, 1990; LIGHT *et al*, 2002). Muitos outros estudos reportam outros déficits na morfologia do SNC, embora nenhum seja tão consistente, como os encontrados no corpo caloso e no cerebelo.

Outros estudos utilizando ressonância magnética demonstram que o volume dos núcleos da base são reduzidos em indivíduos expostos pré-natalmente ao etanol (MATTSON *et al*, 1996) e crianças com SAF (ARCHIBALD *et al* 2001), em particular o núcleo caudado. Nenhuma diferença evidente nos núcleos da base foi encontrada em crianças com desordens de espectro alcoólico fetal (DEAF) não-dismórfica, um espectro mais ameno de acometimento (ARCHIBALD *et al* 2001). Esses resultados corroboram os achados da análise de imageamento por ressonância magnética dos núcleos da base que demonstram nenhuma anormalidade em crianças com DEAF dismórfico e não-dismórfico (AUTTI-RAMO *et al*, 2002). De qualquer modo, esses resultados sugerem que o desenvolvimento normal dos núcleos da base pode ser alterado sob exposição pré-natal ao etanol.

1.4 INFLUÊNCIA DO ETANOL NA PROLIFERAÇÃO DOS PRECURSORES NEURONAIS

A proliferação das populações neuronais ocorre em sítios definidos em períodos de tempo restritos, que variam em função da região do sistema nervoso e da espécie estudada. Esses padrões espaço-temporais são afetados pela exposição pré-natal ao etanol. Várias estruturas já foram examinadas, incluindo segmentos do telencéfalo (neocórtex e formação hipocampal) e do tronco cerebral (cerebelo e ponte).

Demonstrou-se em roedores que a produção neuronal diária durante a primeira metade do período de neurogênese neocortical é deprimida pela exposição pré-natal ao etanol administrado de maneira crônica (MILLER, 1986, 1988). Durante este período, a ZV é a zona proliferativa neocortical majoritária. A exposição pré-natal ao etanol reduz o número total de células e o número de células ciclando na ZV (MILLER, 1989). Além disso, o tempo que as células necessitam para transitar através do ciclo celular é aumentado (MILLER e NOWAKOWSKI, 1991). Quando a ZSV torna-se uma zona proliferativa predominante, outras mudanças induzidas pelo etanol são observadas. A ZSV é afetada pelo etanol de maneira oposta à ZV. O número total de células na ZSV e o número de células ciclando são aumentados pelo etanol (MILLER, 1989; MILLER e NOWAKOWSKI, 1991).

Esses resultados são corroborados por um outro estudo onde os fetos de ratos foram expostos por somente quatro dias durante o período de (1) proeminência da ZSV (entre E18 e E21), (2) proeminência da ZV (entre E12 e E15), ou (3) produção de células tronco neurais (entre E6 e E9) (MILLER, 1996a). A proliferação celular na ZSV e a produção de neurônios gerados mais tardiamente são somente afetadas quando a exposição ao etanol ocorre entre E18 e E21. Além disso, esta exposição aumenta tanto a proliferação como a produção celular. A proliferação das células na ZV e a produção de neurônios gerados no início do desenvolvimento, em contraste, são afetadas quando a exposição é feita entre E12 e E15, isto é, quando a ZV é mais proeminente. Esta exposição ao etanol inibe a proliferação na ZV e reduz o número de neurônios gerados no E15. A exposição ao etanol entre E6 e E9 não afetam tanto a proliferação das células nas zonas proliferativas quanto ao número de neurônios gerados inicialmente ou tardiamente.

As células do hipocampo em desenvolvimento também são afetadas pela exposição ao etanol. Os neurônios da formação hipocampal são gerados, no rato, no período de E15 até a idade adulta (ALTMAN, 1962; ANGEVINE, 1965; SCHLESSINGER *et al*, 1978; BAYER, 1980; MILLER, 1995a), mas a maior parte dos neurônios nos três campos hipocampais, CA1-CA3, e do giro denteado são gerados durante o período embrionário. O sítio de origem desses neurônios é a ZV. Uma exceção notável é que a maior parte dos neurônios granulares (aproximadamente 85%) no giro denteado é gerada no período pós-natal na zona subgranular ou CA4. O DNA total e o conteúdo protéico na formação hipocampal são diminuídos em animais expostos pré-natalmente ao etanol (MILLER, 1996b). Em contraste, a exposição pós-natal aumenta tanto o conteúdo protéico quanto o de DNA. Estudos anatômicos demonstram que animais expostos pré-natalmente ao etanol de maneira crônica apresentam uma diminuição do número total de neurônios no segmento CA1 do hipocampo e esta exposição tem pouco impacto no número neuronal no giro denteado (MILLER, 1995a). Quando o tratamento é feito pós-natal de maneira crônica o que se observa é um aumento no número total de neurônios no giro denteado e nenhum efeito nas células do segmento CA1. Essas mudanças pós-natais são dependentes da concentração de etanol sangüínea. Em concentrações moderadas (aproximadamente 150 mg/dl), o número total de neurônios no giro denteado e o número de neurônios gerados ficam aumentados. Em altas concentrações (maiores que 250 mg/dl), entretanto, o número neuronal e a geração de novos neurônios ficam reduzidos (MILLER *et al*, 1995a). De maneira interessante, foi observado que uma única dose de etanol administrada por gavagem em ratos adolescentes provoca uma diminuição da proliferação celular no giro denteado de maneira dose dependente (CREWS *et al*, 2006). Assim, os efeitos

provocados pelo etanol no hipocampo dependem da dose administrada, se a dose é administrada de maneira crônica ou aguda, do período de desenvolvimento no qual o etanol é administrado e do local de análise.

Os efeitos da exposição gestacional crônica ao etanol no núcleo sensorial principal do nervo trigeminal e cerebelo também foram examinados. O núcleo sensorial principal do nervo trigeminal é uma estrutura simples, onde todos os neurônios são derivados da ZV pontina. A exposição pré-natal ao etanol reduz o número de neurônios neste núcleo (MILLER e MULLER, 1989; MILLER, 1995b) e esta redução é parcialmente (2/3) devida a uma diminuição da geração de neurônios e parcialmente (1/3) devido à exacerbação de mecanismos de morte celular que ocorrem naturalmente (MILLER, 1999).

O cerebelo também é vulnerável ao etanol. Os neurônios cerebelares são gerados em dois sítios: na ZV e em uma zona proliferativa derivada da ZV, a camada granular externa. A atenção foi direcionada a camada granular externa por ser uma zona proliferativa proeminente no período pós-natal em ratos e por ser a fonte geradora do tipo neuronal mais populoso do SNC, os neurônios granulares cerebelares. A exposição pós-natal a altos níveis de etanol prolonga a existência da camada granular externa e retarda a sua depleção (BAUER-MOFFETT e ALTMAN, 1977; KORNGUTH *et al*, 1979). Além disso, a proliferação celular na camada granular externa é reduzida. Esses resultados sugerem que a camada granular externa é diferente de outras zonas proliferativas derivadas da ZV por sua atividade proliferativa não ser estimulada pelo etanol.

Estudos em neuroesferas obtidas do neuroepitélio cortical de ratos embrionários demonstraram que o etanol promove a progressão do ciclo celular, aumento no número e na diversidade de tamanho das neuroesferas (SANTILLANO *et*

al, 2005). Diferente dos controles, os progenitores expostos ao etanol exibiram evidências morfológicas para divisão assimétrica e as células derivadas de neurosféricas pré-tratadas com etanol exibiram uma diminuição da capacidade proliferativa. Além disso, a proliferação das neurosféricas induzida pelo etanol não foi acompanhada por um aumento comensurável na atividade telomerase, sugerindo que a maturação neuroepitelial é acompanhada por um aumento potencial da instabilidade genômica, embora não seja observado um aumento na apoptose (SANTILLANO *et al*, 2005; PLOCK e MIRANDA, 2007). Foi observado que esses efeitos provocados pelo etanol podem ser mediados por interações competitivas de micro-RNAs, moléculas de RNA não codificante contendo 18-25 nucleotídeos que são importantes reguladores da estabilidade dos transcritos de RNA mensageiro e tradução gênica (SATHYAN *et al*, 2007).

Estudos em neurosféricas obtidas das eminências ganglionares de ratos embrionários (E15) demonstraram que altas concentrações de etanol (50mM) em cultura afetam a proliferação, gliogênese e neurogênese, embora os efeitos mais profundos sejam observados no fenótipo glial (VEMURI e CHETTY, 2005). Neste estudo o tratamento das neurosféricas em cultura com etanol resulta em uma diminuição dose-dependente no número de células nestas culturas e uma redução na síntese de DNA, sugerindo que a habilidade proliferativa das células precursoras nas neurosféricas seja comprometida.

O efeito da exposição pré-natal ao etanol sobre a proliferação celular nas eminências ganglionares *in vivo* ainda não são conhecidos, sendo assim objeto de estudo desta dissertação.

1.5 INFLUÊNCIA DO ETANOL NA MIGRAÇÃO NEURONAL

A migração neuronal é um componente único e crítico para o desenvolvimento neural. Ela providencia uma ponte entre o local de nascimento da célula e sua correta integração em uma estrutura desenvolvida. As desordens na migração neuronal são causadas por avarias na iniciação, conclusão e/ou interrupção da migração neuronal. As desordens de migração neuronal detectadas nos casos de SAF são relacionadas à interferência do etanol em cada uma dessas fases de migração neuronal. Diversas regiões encefálicas em modelos animais de SAF apresentam defeitos morfológicos, incluindo heterotopias e desorganização estrutural, similares às encontradas em humanos. Essas regiões incluem o córtex cerebral (MILLER, 1986; KOTKOSKIE e NORTON, 1988; KOMATSU *et al*, 2001; MOONEY *et al*, 2004), estriado (HEATON *et al*, 1996), mesencéfalo (SARI *et al*, 2001; ZHOU *et al*, 2001), e cerebelo (KORNGUTH *et al*, 1979; BORGES e LEWIS, 1983; QUESADA *et al*, 1990a, 1990b).

O córtex cerebral é a região encefálica onde mais se descrevem malformações provocadas por desordens na migração neuronal. O etanol interrompe a migração cortical em muitos níveis reduzindo a taxa de migração neuronal no córtex cerebral em desenvolvimento (Figura 2A). Os neurônios migrantes dependem de moléculas apropriadas de adesão celular (por exemplo, integrinas) e reorganização do citoesqueleto (por exemplo, microtúbulos e actina) para se moverem ao longo das fibras de glia radial. O etanol provoca um aumento na expressão de moléculas de adesão celular como NCAM (MILLER e LUO, 2002a; SIEGENTHALER e MILLER, 2004; HIRAI *et al*, 1999b; LUO e MILLER, 1999) e integrinas (SIEGENTHALER e MILLER, 2004), além de bloquear fisicamente a

ligação homofílica das moléculas de adesão celular L1 presentes na superfície celular e na matriz extracelular (CHARNESS *et al*, 1994; RAMANATHAN *et al*, 1996; WILKEMEYER *et al*, 1999, 2000, 2002a, 2002b). Além disso, o etanol afeta a organização normal dos filamentos de actina nas células da crista neural tratadas em cultura (HASSLER e MORAN, 1986a, 1986b) e em astrócitos em cultura (YOON *et al*, 1998; ALLANSSON *et al*, 2001; GUASCH *et al*, 2003; TOMÁS *et al*, 2003). Juntos, esses efeitos provocados pelo etanol podem reduzir a mobilidade celular (Figura 2A).

A formação das heterotopias pode ser ligada a alterações nos componentes da matriz celular da membrana pial (Figura 2B). A deleção ou disfunção das proteínas na membrana pial como laminina (HALFTER *et al*, 2002), perlecana (COSTELL *et al*, 1999) e proteoglicanos de condroitim sulfato (BLACKSHEAR *et al*, 1997) provocam uma migração excessiva de neurônios na superfície pial e formação de ectopias que se assemelham às heterotopias induzidas pelo etanol. Em particular, a ausência dos sinais de parada pela relina podem contribuir para a formação de heterotopias. Acredita-se que a relina atue como um sinal de parada nos neurônios no período final de migração, induzindo o seu descolamento das fibras de glia radial (PEARLMAN e SHEPPARD, 1996; MARÍN-PADILLA, 1998; DULABON *et al*, 2000; HACK *et al*, 2002). Estudos imunohistoquímicos demonstraram que a relina é anormalmente distribuída nas heterotopias induzidas pelo etanol (MOONEY *et al*, 2004).

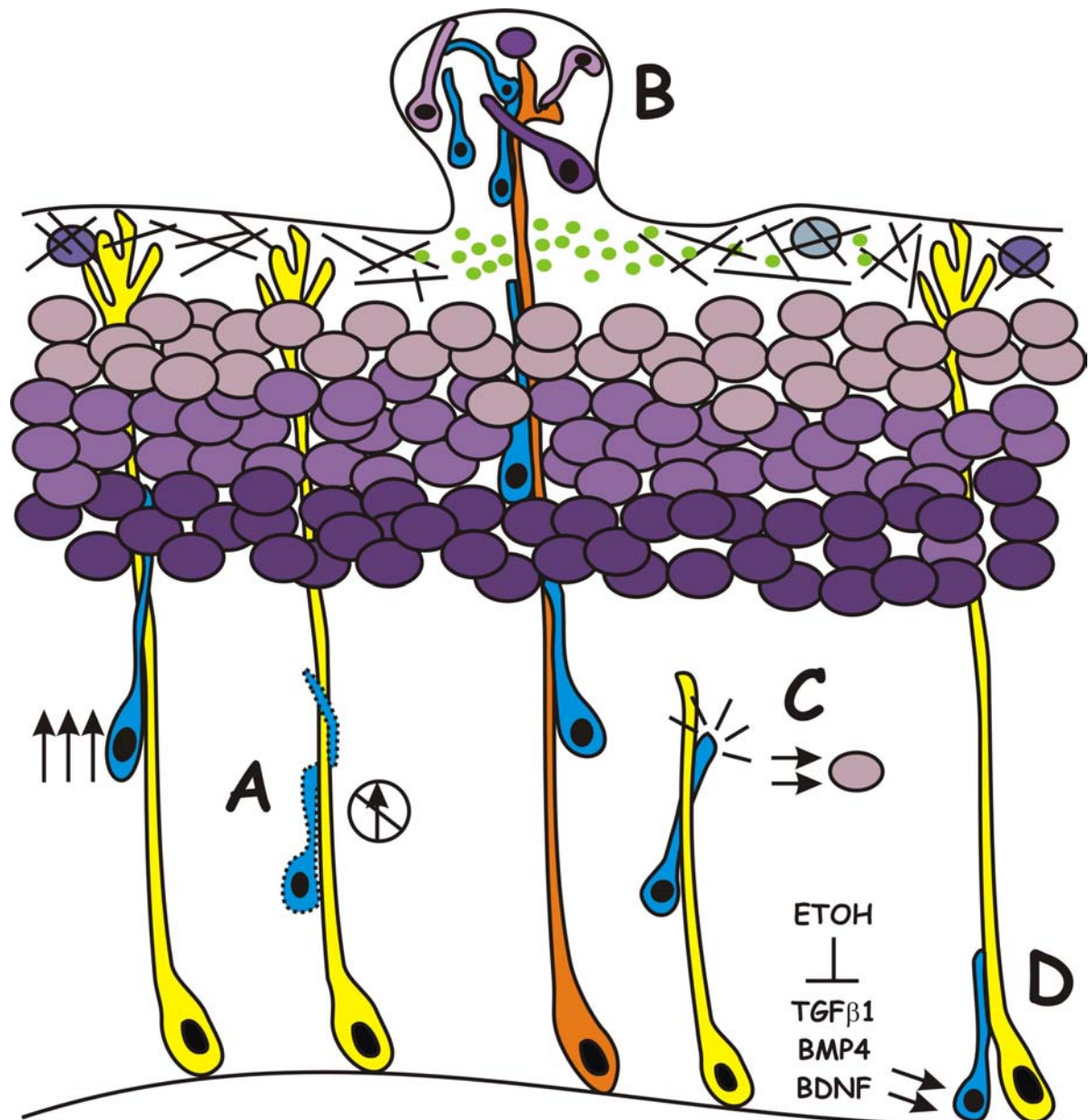


Figura 2: O etanol altera a migração cortical de diversas maneiras. (A) O etanol pode reduzir a taxa de migração neuronal no córtex cerebral em desenvolvimento. (B) Alterações nos componentes da matriz celular pial induzida pela exposição ao etanol podem induzir uma migração excessiva de neurônios na superfície pial, resultando na formação de heterotopias. (C) A exposição ao etanol pode provocar uma transformação prematura da glia radial em astrócito. Desse modo, os neurônios que estariam migrando por esses feixes de glia radial em processo de diferenciação ficariam retidos em camadas corticais mais profundas. (D) Vários fatores de crescimento que estão envolvidos no processo de iniciação da migração neuronal têm suas funções alteradas pelo etanol (modificado de MILLER, 2006).

A exposição ao etanol provoca uma transformação prematura da glia radial em astrócitos e degradação prematura da rede de glia radial (MILLER e ROBERTSON, 1993), além de reduzir a quantidade de progenitores de glia radial (RUBERT *et al*, 2006). Assim, os neurônios não migrariam pelos feixes de glia radial e ficariam retidos em camadas corticais profundas (Figura 2C). Esse fenômeno pode explicar o aparecimento de neurônios da camada II/III em camadas mais profundas, como as camadas IV, V e VI, em cérebros expostos ao etanol (MILLER, 1986).

Vários fatores de crescimento estão envolvidos na iniciação da migração neuronal, como TGF β 1, BMP-4 e BDNF. O etanol altera a função normal desses fatores de crescimento (Figura 2D). Ratos expostos a etanol exibem alterações na expressão de receptores e ligantes de TGF β (MILLER, 2003) e alterações na migração neuronal mediada por TGF β 1 (SIEGENTHALER e MILLER, 2004, 2005b). Embora os efeitos do etanol na iniciação da migração mediada por BMP não sejam descritos, foi observado que o etanol pode bloquear a adesão celular induzida por BMP-4 em células de neuroglioblastoma em cultura (WILKEMEYER *et al*, 1999). Além disso, a exposição ao etanol reduz a expressão de mRNA de BDNF e seu receptor, trkB, no cerebelo em desenvolvimento (HEATON *et al*, 2000; LIGHT *et al*, 2001) e no bulbo olfatório (MAIER *et al*, 1999). Uma diminuição similar dos níveis de BDNF também é observada no córtex pré-natal exposto ao etanol (CLIMENT *et al*, 2002).

Os efeitos induzidos pelo etanol na migração neuronal causam sérias conseqüências nos eventos posteriores de desenvolvimento. Por exemplo, a exposição ao etanol durante o período de migração neuronal pode fazer com que neurônios se estabeleçam em camadas corticais inadequadas (MILLER, 1986, 1987). Como os corpos celulares estão distribuídos em locais inapropriados eles irão

se integrar na rede sináptica incorretamente (AL-RABIAI e MILLER, 1989). Conseqüentemente, anormalidades na atividade e no metabolismo cortical podem ocorrer (VINGAN *et al*, 1986; MILLER e DOW-EDWARDS, 1988, 1993). As conexões sinápticas imperfeitas devido às heterotopias podem causar diversos problemas, como a epilepsia (CHEVASSUS-AU-LOUIS e REPRESA, 1999), um sintoma neurológico prevalente em crianças com SAF (BURD *et al*, 2003).

1.6 INFLUÊNCIA DO ETANOL NA MORTE CELULAR

Uma característica evidente na SAF é a microencefalia (LEMOINE *et al*, 1968; JONES e SMITH, 1973). O etanol pode contribuir para a formação desta anormalidade reduzindo os processos ontogênicos progressivos (proliferação celular e migração neuronal) e aumentando a morte celular neuronal. Estudos *in vivo* demonstraram que o etanol afeta os padrões espaço-temporais de morte celular no sistema nervoso.

Uma das regiões estudadas é o núcleo sensorial principal do nervo trigeminal, que no rato, em condições normais, possui 28.000 neurônios. Após a exposição pré-natal ao etanol durante o período de proliferação e migração dos neurônios do núcleo sensorial principal do nervo trigeminal, este número neuronal diminui para 19.000 (MILLER e MULLER, 1989; NORNES e MORITA, 1979; AL-GHOUL e MILLER, 1993a). Esta redução é parcialmente (2/3) devida a uma diminuição da geração de neurônios e parcialmente (1/3) devido à exacerbação de mecanismos de morte celular que ocorrem naturalmente (MILLER, 1999). Os neurônios deste núcleo também morrem quando a exposição ocorre durante o período de sinaptogênese, isto é, após o nascimento e antes do décimo dia pós-natal (ASHWELL e WAITE,

1991; AL-GHOUL e MILLER, 1993b; MILLER e AL-GHOUL, 1993). Em contraste, a exposição durante a adolescência não afeta o número neuronal (MILLER, 1995b). Assim, os períodos críticos para a morte celular induzida pelo etanol no núcleo sensorial principal do nervo trigeminal são os períodos de geração neuronal e sinaptogênese.

Ratos expostos ao etanol possuem um cerebelo menor do que ratos não expostos (DIAZ e SAMSON, 1981; WEST *et al*, 1989), devido a um aumento de morte celular. Os estudos no número neuronal no cerebelo se concentraram nas células de Purkinje (GOODLETT e HORN 2001; LIGHT *et al*, 2002). Ratos adultos expostos ao etanol durante o período pós-natal (P) de P4 a P10 possuem significativamente menos neurônios do que os ratos não expostos. A perda das células de Purkinje varia de 10 a 70%, dependendo do compartimento cerebelar e do estado de maturação deste compartimento. Por exemplo, os lóbulos I-V, IX e X são mais vulneráveis ao etanol do que os lóbulos VI e VII (PIERCE *et al*, 1989; GOODLETT *et al*, 1990). O desenvolvimento dos neurônios nos lóbulos I, II, IX e X precede o desenvolvimento dos neurônios dos lóbulos VI e VII (MIALE e SIDMAN, 1961; ALTMAN e DAS, 1966; ALTMAN e BAYER, 1978). Estudos adicionais verificando os efeitos da exposição aguda ao etanol apóiam a idéia que o etanol provoca morte celular dos neurônios de Purkinje. Nestes estudos foi verificado que a exposição ao etanol acarreta um aumento na expressão de caspase-3 e na fragmentação de DNA (LIGHT *et al*, 2002; DIKRANIAN *et al*, 2005).

As exposições pré e pós-natal ao etanol induzem diferenças no número de células corticais. O conteúdo total de DNA é diminuído em 29% nos córtices de ratos expostos pré-natalmente ao etanol em relação a ratos não expostos (MILLER, 1996b). A exposição pré-natal ao etanol não afeta todas as regiões corticais

igualmente, visto que a exposição ao etanol reduz em 33% o número de neurônios no córtex somatossensório (MILLER e POTEPA, 1990) e nenhuma diferença é encontrada no córtex visual (MOONEY *et al.*, 1996; MOONEY e NAPPER, 2005). A exposição pós-natal ao etanol também provoca uma diminuição no conteúdo de DNA, embora esta diferença seja somente de 13% (MILLER, 1996c).

Mudanças no número celular são acompanhadas por alterações na expressão de proteínas associadas à morte neuronal, incluindo ALZ-50 (KUHN e MILLER, 1998), proteínas bcl-2 e caspase-3 ativada (MOONEY e MILLER, 2000). A expressão dessas proteínas aumentam durante a primeira e segunda semana pós-natal. O etanol significativamente afeta cada um desses marcadores, na maioria das vezes retardando o seu período de expressão (KUHN e MILLER, 1996; Mooney e Miller, 2001).

Em regiões neocorticais (córtex somatossensorial) há diminuição de neurônios GAD+ nas camadas II/III de porcos da Índia submetidos cronicamente ao álcool. Tais dados sugerem perda de células GABAérgicas (seja por diminuição da proliferação ou por morte dos precursores GABAérgicos, ou por déficits de migração dos interneurônios GABAérgicos para seus sítios terminais corticais), ou falha na expressão da GAD durante o desenvolvimento (BAILEY *et al.*, 2004). Não existem dados acerca dos possíveis efeitos do etanol diretamente sobre os precursores GABAérgicos nas eminências ganglionares.

Tendo em vista que a exposição pré-natal ao etanol provoca uma redução no volume nos núcleos da base nos indivíduos expostos ao etanol (MATTSON *et al.*, 1996) e que estudos em animais sugerem uma diminuição de neurônios GABAérgicos nas camadas II/III de porcos da Índia submetidos cronicamente ao álcool (BAILEY *et al.*, 2004) e, considerando que as eminências ganglionares são a

fonte geradora de células GABAérgicas corticais, além de originarem os núcleos da base, decidimos investigar se a exposição pré-natal ao etanol pode contribuir para a formação destas anormalidades, reduzindo os processos ontogênicos progressivos (proliferação celular) e/ou aumentando a morte celular dos precursores neuronais nas eminências ganglionares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos da administração pré-natal de etanol por um curto período sobre a proliferação e morte de progenitores GABAérgicos nas eminências ganglionares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o ritmo de proliferação normal nas zonas proliferativas (ventricular e subventricular) das eminências ganglionares medial, lateral e caudal, e compará-las com o grupo exposto ao etanol.

- Caracterizar a morte celular nas zonas proliferativas das eminências ganglionares medial, lateral e caudal, e compará-las com o grupo exposto ao etanol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

A manipulação dos animais seguiu as orientações da CUAP-CCS. Todos os esforços foram realizados de modo a minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

Camundongos (*Mus musculus*) fêmeas suíças (10 fêmeas no total) foram obtidas da colônia do biotério do Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todos os animais foram mantidos em caixas contendo ração e água, em ambiente com temperatura controlada entre 23-25°C e fotoperíodo de 12/12h claro/escuro. Para a obtenção de embriões, os animais foram acasalados num período de 15-17 horas e o tampão vaginal inspecionado na manhã seguinte ao acasalamento. O peso corporal foi verificado periodicamente para confirmação e progressão da gestação. Denominou-se E1 o primeiro dia embrionário (dia da verificação do tampão vaginal).

3.2 TRATAMENTO

Dois grupos foram formados para o experimento: o grupo tratado com etanol e o grupo controle. Ao grupo tratado com etanol foi administrado etanol (VETEC, apresentando 99,8% de pureza e 0,2% de H₂O) na concentração de 2g/Kg (43,41mmol/Kg) de peso corpóreo do animal diluído 50% em salina tamponada com fosfato (PBS) e no grupo controle foi administrado somente PBS. Esse tratamento ocorreu do décimo primeiro dia embrionário (E11) ao décimo quarto dia embrionário

(E14) e realizou-se por gavagem. A gavagem foi feita entre 9:00 e 10:00 da manhã por contenção manual sem a utilização de anestésicos.

3.3 INJEÇÃO DE BRDU

No décimo quarto dia embrionário (E14), 30 minutos após a gavagem, foi injetada intraperitonealmente nas fêmeas grávidas uma solução de 10mg/ml contendo bromo-deoxiuridina (BrdU) 50mg/kg do animal. Esta injeção foi feita por contenção manual sem a utilização de anestésicos.

3.4 PREPARAÇÃO DO TECIDO

Uma hora após a última gavagem, as fêmeas foram sacrificadas por inalação de vapor de éter, os embriões retirados através de incisão cesárea e imediatamente decapitados. As cabeças foram imersas em solução tamponada de paraformaldeído a 4% por 3h. Em seguida os encéfalos passaram por soluções de sacarose 10, 20 e 30%, respectivamente. Então, os encéfalos foram incluídos em OCT (*Tissue Medium Freezing* SAKURA), congelados em nitrogênio líquido e cortados coronalmente a 12 µm de espessura em criostato a -20°C. Estes cortes foram coletados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina 1% e estocadas em freezer a -20°C até o início da reação histoquímica. Foram coletadas lâminas alternadas que se destinavam a imunohistoquímica para BrdU e coloração por vermelho neutro e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes).

3.5 DOSAGEM DE ETANOL NO SANGUE

A determinação quantitativa dos níveis de etanol no sangue foi feita pela utilização do kit *Alcohol Reagent Set (Pointe Scientific)* seguindo o protocolo do fabricante. Uma hora após a última gavagem as fêmeas foram sacrificadas por inalação de vapor de éter e o sangue coletado por punção cardíaca. O nível de etanol no sangue foi de, em média, 110mg/dL.

3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA BRDU

As lâminas contendo os cortes histológicos foram lavadas com H₂O destilada e incubadas em tampão citrato 10mM pH 6,0 no microondas até ferver. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 5 minutos com tampão fosfato salina (PBS pH 7,4), incubadas por 30 minutos com H₂O₂ 3% diluído em PBS para inibir a peroxidase endógena, e lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS. Logo após, as lâminas foram incubadas por 15 minutos com triton X-100 0,5% diluído em PBS, lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 15 minutos com 50mM de cloreto de amônio diluído em PBS para reduzir o *background*. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS, incubadas por 30 minutos com albumina do soro bovino (BSA) 5% diluído em PBS e incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo anti-BrdU do kit RPN 202 (Amersham Biosciences) diluído 1:3 em BSA 5%. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS e incubadas por 45 minutos com o anticorpo secundário biotilado anti-camundongo (VECTOR) diluído 1:400 a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS, incubadas por 30 minutos com os reagentes A e B do

kit HRP-ABC (Vector) na temperatura ambiente e, em seguida, lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS. As lâminas foram reveladas com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (SIGMA) 5mg/ml diluído em tampão tris 0,1M pH 7,6 e utilizou-se H₂O₂ (6,3 mM) diluído em H₂O como substrato da peroxidase. Após a revelação, as lâminas foram incubadas por 10 minutos com o intercalante de DNA fluorescente DAPI (SIGMA) 100mg/l. As lâminas foram montadas em N-propil-galato 4% em glicerol 80% diluído em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e vedadas com esmalte.

3.7 COLORAÇÃO COM VERMELHO NEUTRO

As lâminas foram incubadas por 5 minutos em tampão acetado 5% pH 3,3 diluído em H₂O destilada seguida de incubação por 5 minutos com solução de vermelho neutro (SIGMA) 0,5% em tampão acetato pH 5,2. Após isso, as lâminas foram lavadas três vezes com tampão acetato 5% pH 3,3 para retirar o excesso de corante, deixando-as secar durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, as lâminas foram imersas por 1 minuto em álcool absoluto, seguida de imersão por 5 minutos em xilol e montagem em entelan.

3.8 COLORAÇÃO COM DAPI

Para se estimar o tamanho das eminências ganglionares, as lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas por 10 minutos apenas com DAPI 100mg/l e lavadas duas vezes por 5 minutos com PBS. As lâminas foram montadas em N-propil-galato 4% em glicerol 80%, diluído em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e vedadas com esmalte e conservadas a 4°C.

3.9 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

- Sítio de análise

As análises foram feitas em duas porções (rostral e caudal) das eminências ganglionares (Figura 3A) baseadas nos marcadores anatômicos descritos a seguir. Na porção rostral, as eminências ganglionares lateral e medial são claramente identificadas e separadas por um sulco profundo e estreito (Figura 3B) e, na porção caudal, somente uma eminência é observada (Figura 3C). Somente aquelas secções que apresentaram todos os marcadores anatômicos foram utilizadas para as análises. O número de cortes analisados está indicado em cada figura dos Resultados. Todas as análises foram feitas diretamente ao microscópio.

- Estimativa do tamanho das eminências ganglionares

Para se estimar o tamanho das eminências ganglionares utilizamos as lâminas coradas apenas com DAPI.

Com auxílio de uma régua ocular, o tamanho das zonas proliferativas e da zona do manto (e regiões subjacentes, incluídas aqui, como zona do manto) foram estimadas. Essas regiões possuem densidades celulares distintas e são facilmente discriminadas ao DAPI (Figura 4A). As análises foram realizadas no centro das eminências ganglionares em duas porções (rostral e caudal) e baseadas nos marcadores anatômicos descritos anteriormente (Figura 3). O tamanho das eminências ganglionares foi calculado somando o tamanho das zonas proliferativas com o tamanho da zona do manto. As análises foram feitas por um experimentador cego à condição experimental do animal.

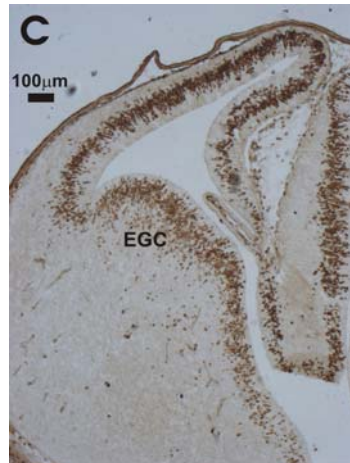
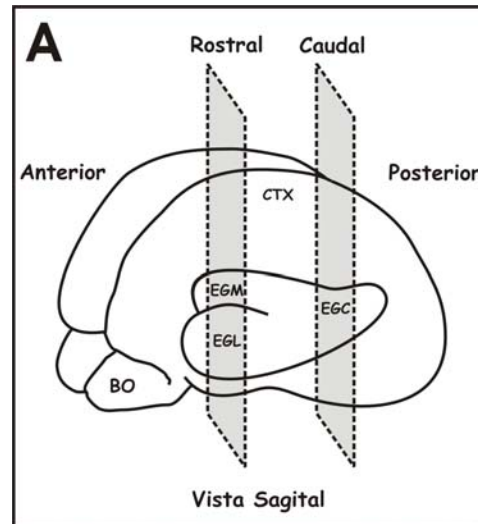


Figura 3: Variações rostro-caudal dos marcadores anatômicos das eminências ganglionares. (A) ilustração demonstrando uma vista lateral do telencéfalo de roedores, revelando as eminências ganglionares. (B) e (C) As fotomicrografias de 12 μ m de espessura no plano coronal através do encéfalo de embriões de camundongos E14 ilustram os sítios de análises na porção rostral (B) e caudal (C) das eminências ganglionares. Os embriões foram expostos a bromodeoxiuridina (BrdU) *in útero* por 30 minutos. As secções foram processadas por imunohistoquímica para BrdU e os núcleos imunopositivos para BrdU aparecem em marrom. As setas indicam o sulco entre a eminência ganglionar medial (EGM) e a eminência ganglionar lateral (EGL). O sulco é mais proeminente na porção rostral (B) e inexistente na porção caudal (C), onde somente a eminência ganglionar caudal (EGC) é observada. CTX, neocórtex; BO, bulbo olfatório. Barras de escala 100 μ m.

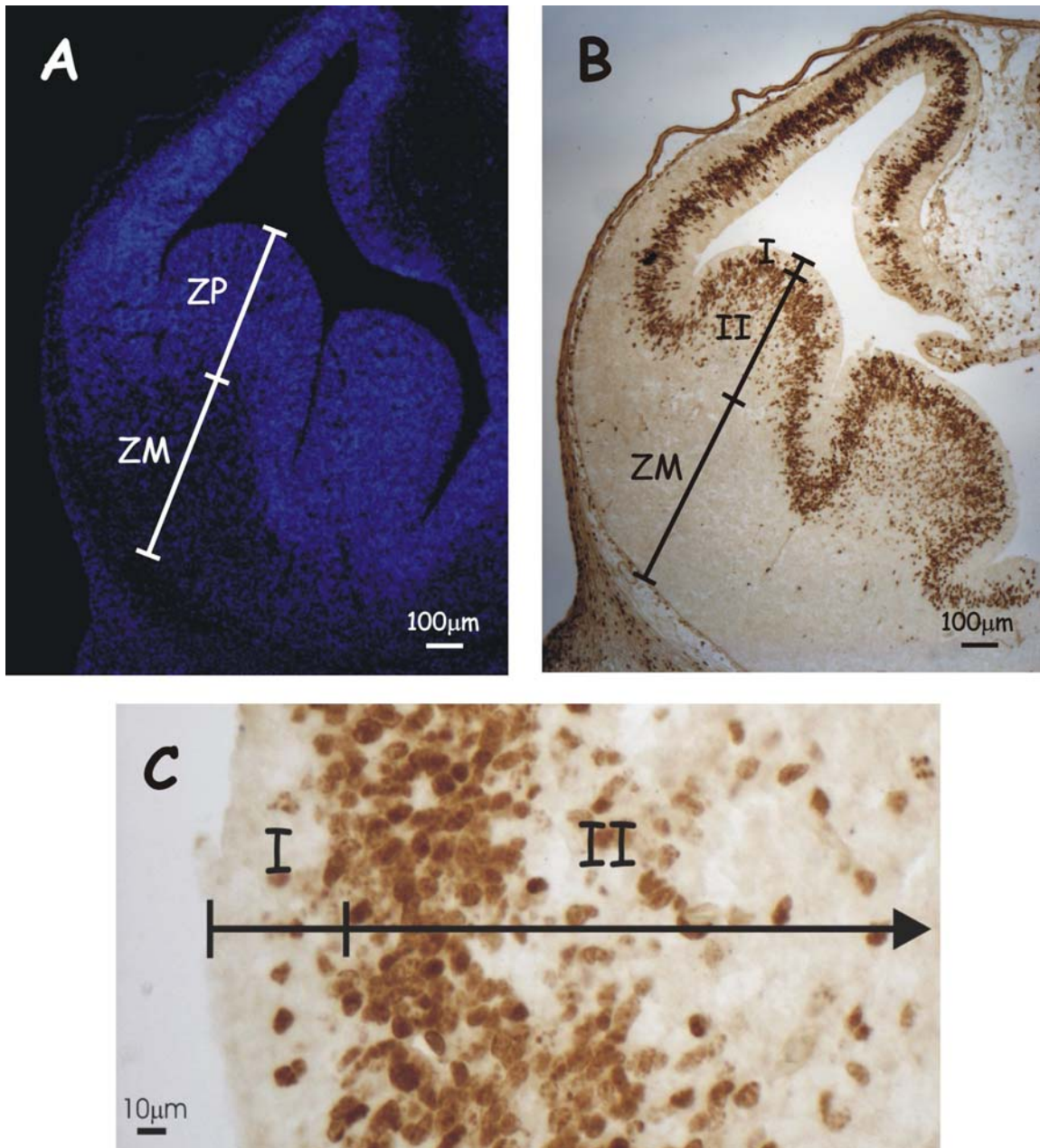


Figura 4: Técnica de medida do tamanho das eminências ganglionares e das zonas proliferativas (ZP). (A) Com um auxílio de uma régua ocular o tamanho da ZP e da zona do manto (ZM) foi estimada. Essas regiões possuem densidades celulares distintas e são facilmente discriminadas quando o tecido é corado com DAPI, um intercalante de DNA fluorescente. O tamanho das eminências ganglionares foi calculado somando o tamanho das zonas proliferativas com o tamanho da zona do manto. (B) e (C) O tamanho da zona ventricular e da zona subventricular foi estimada utilizando as lâminas imunorreagidas para BrdU e uma régua ocular. Devido a grande sobreposição entre essas duas populações celulares (Figura 1) só foi possível distinguir duas populações: células da ZV passando por G1, G2 e M (região I); e células da ZSV sobrepostas com células da ZV passando pela fase S do ciclo celular (região II). Barras de escalas 100 μm em (A) e (B) e 10 μm em (C).

- Estimativa do tamanho da ZV e da ZSV das eminências ganglionares

Para se estimar o tamanho da ZV e da ZSV foram utilizadas as lâminas imunorreagidas para BrdU e contracoradas com DAPI e uma régua ocular. As análises foram feitas no centro das eminências ganglionares em duas porções (rostral e caudal) baseada nos marcadores anatômicos descritos anteriormente (Figura 3). Devido a grande sobreposição entre essas duas populações celulares (Figura 1) só foi possível distinguir duas populações: células da ZV passando por G1, G2 e M; e células da ZSV sobrepostas com células da ZV passando pela fase S do ciclo celular (Figura 4B e 4C). As análises foram feitas por um experimentador cego à condição experimental do animal.

- Estimativa do índice de marcação (IM)

O IM é a taxa entre os núcleos marcados para BrdU e o número total de núcleos por unidade de área. O IM foi calculado e analisado baseado no método descrito para o neuroepitélio cortical (TAKAHASHI *et al*, 1992 e 1993) e ganglionar (BHIDE, 1999). Um setor de $120 \times 240 \mu\text{m}^2$ foi delimitado com auxílio de um retículo ocular na imagem da eminência ganglionar observada em lente objetiva de 100X (retângulo na Figura 5). Admitindo-se que o retículo possui $120 \times 120 \mu\text{m}^2$, foi necessário deslocar uma vez o corte no eixo radial para a análise total dos $240 \mu\text{m}$. Logo após, esse setor foi subdividido em 20 partes iguais de $12 \times 120 \mu\text{m}^2$ e numerados de 1-20, sendo a faixa (ou bin) número 1, adjacente à borda ventricular (Figura 6A). O número de núcleos BrdU positivos foram contados, bem como os núcleos BrdU negativos, isto é, apenas os núcleos DAPI positivos. Quando o núcleo posicionava-se exatamente na intersecção de duas faixas, considerávamos o núcleo na faixa mais próxima ao ventrículo. Em seguida, o IM foi calculado para cada faixa

e os valores de cada IM foram representados graficamente em função da distância de cada faixa a partir da borda ventricular (Figura 6B). Para cada encéfalo, três secções não consecutivas foram analisadas em cada porção rostro-caudal. Um mínimo de 450 núcleos foram contados para cada secção e, desse modo, pelo menos 1350 núcleos foram contados para cada eminência em cada uma das porções estudadas de cada embrião. Foram utilizados, no máximo, dois embriões por fêmea alcoolizada.

- Estimativa da zona de fase S e delimitação das zonas proliferativas

A zona de fase S, uma região que agrega a maior parte dos núcleos na fase S foi estimada como sendo uma região que possui pelo menos 50% do IM máximo (BHIDE, 1996) (Figura 7). A região mais próxima ao ventrículo lateral que contém a zona de fase S a partir do IM máximo foi considerada como sendo a região da ZV que contém células passando pela fase S; e a região mais distante do ventrículo lateral que contém a zona de fase S a partir do IM máximo foi considerado como sendo a região da ZSV que contém as células passando pela fase S.

- Contagem do número de células em processo de morte

Nas lâminas coradas com vermelho neutro, um setor de 120 X 240 μm^2 foi delimitado com um auxílio de um retículo ocular na imagem das eminências ganglionares observada em uma lente objetiva de 100X (retângulo na Figura 8A), e todas as células que apresentavam um núcleo condensado ou fragmentado foram consideradas células mortas (Figura 8B)

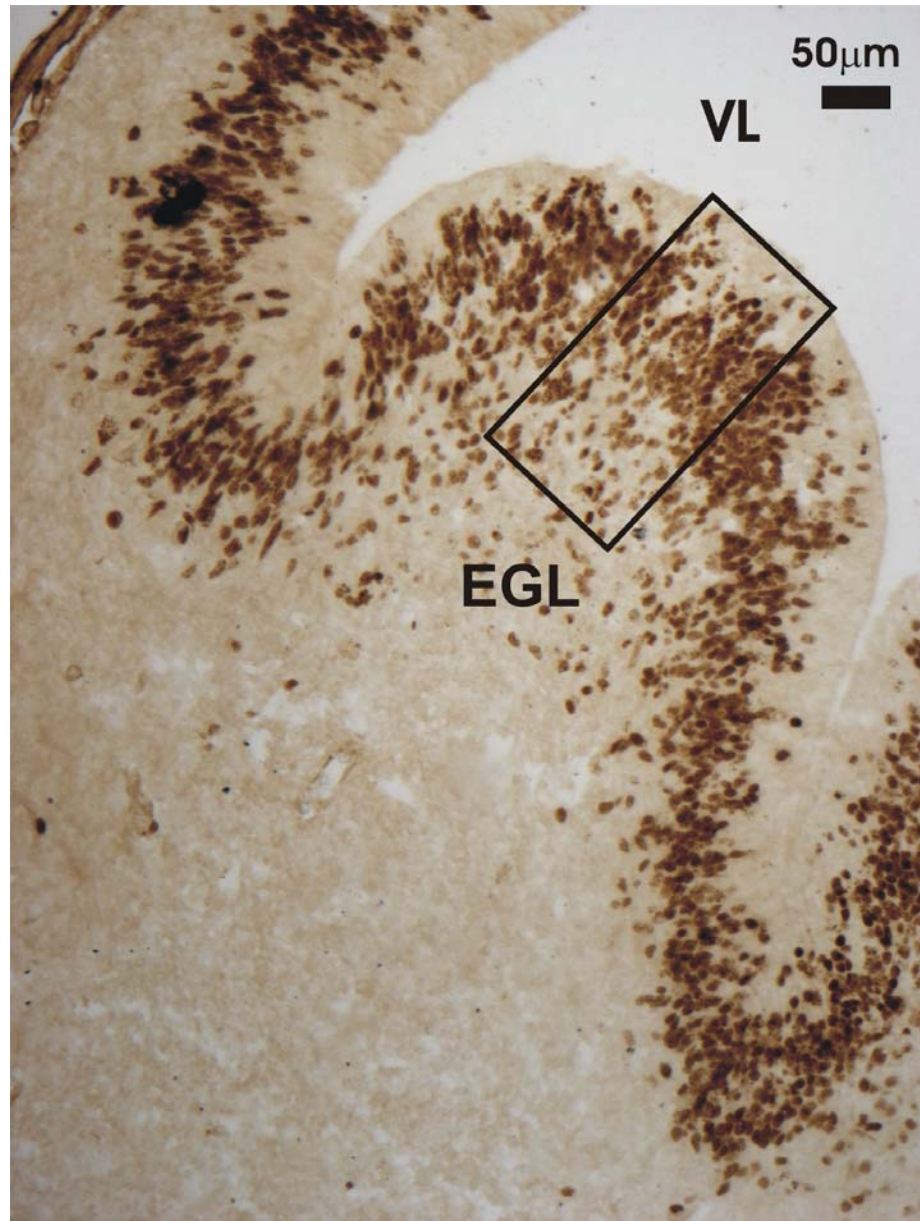


Figura 5: Sítio de análise nas eminências ganglionares. O embrião foi exposto a bromodeoxiuridina (BrdU) in *útero* por 30 minutos. As secções foram processadas por imunohistoquímica para BrdU e os núcleos imunopositivos para BrdU aparecem em marrom. A fotomicrografia de 12µm de espessura no plano coronal através do encéfalo de embriões de camundongos E14 na porção rostral ilustra a área de análise. A área retangular indica o sítio da análise quantitativa na eminência ganglionar lateral (EGL). Note que uma das bordas da área retangular é contígua à borda do ventrículo lateral (VL). Barra de escala 50 µm.

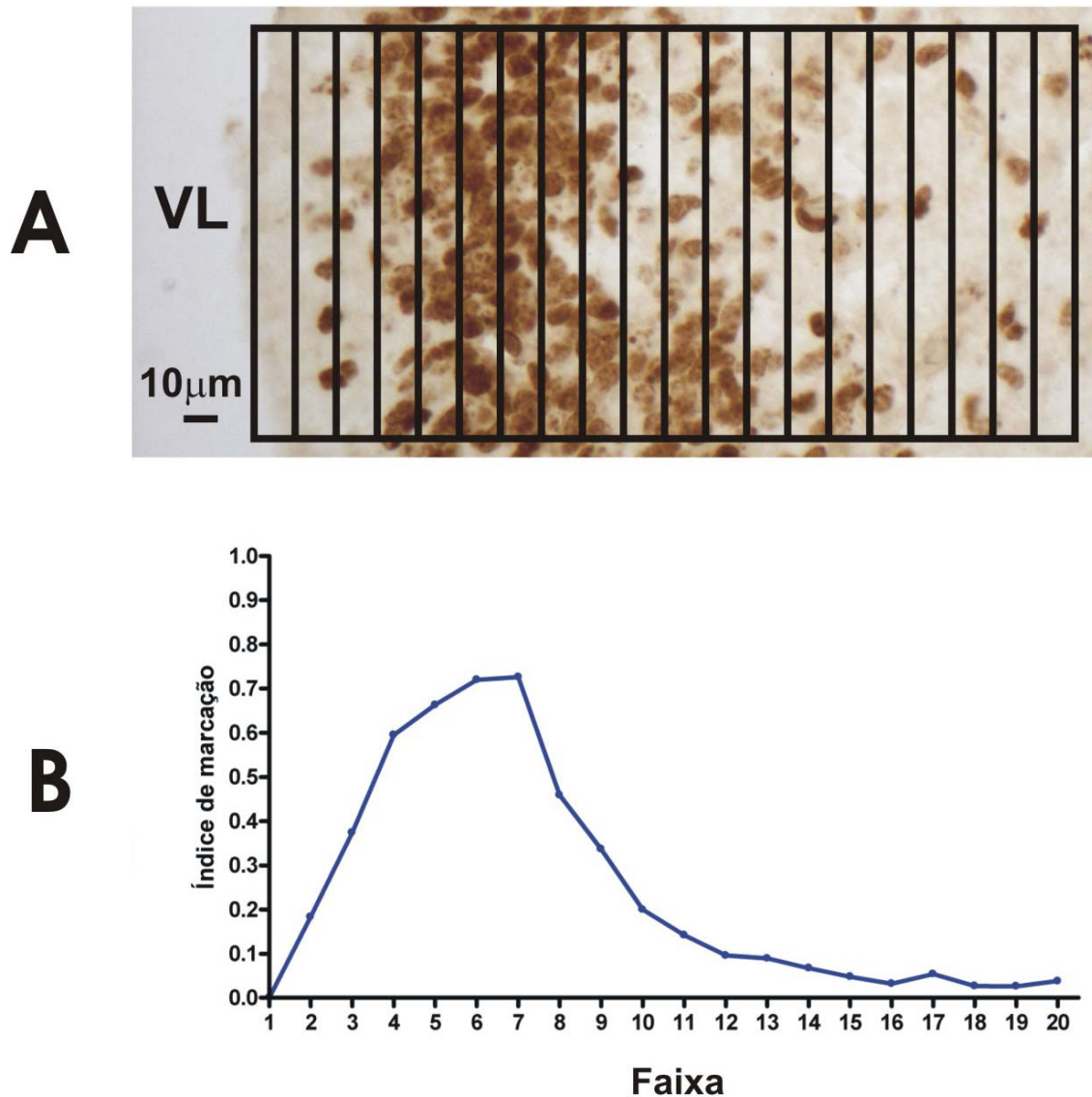


Figura 6: Subdivisão das eminências em faixas e estimativa do índice de marcação (IM). (A) Fotomicrografia de 12 μ m de espessura no plano coronal através do encéfalo de embriões de camundongos E14 na porção caudal ilustrando a divisão da zona proliferativa em faixas ou “bins”. Cada faixa possui aproximadamente 12 X 120 μ m de espessura e é paralela a borda do ventrículo lateral (VL). A faixa 1 é adjacente ao VL. (B) Em cada uma das faixas é calculado o IM e este índice representado graficamente em função da distância de cada faixa a partir da borda ventricular. Barra de escala 10 μ m.

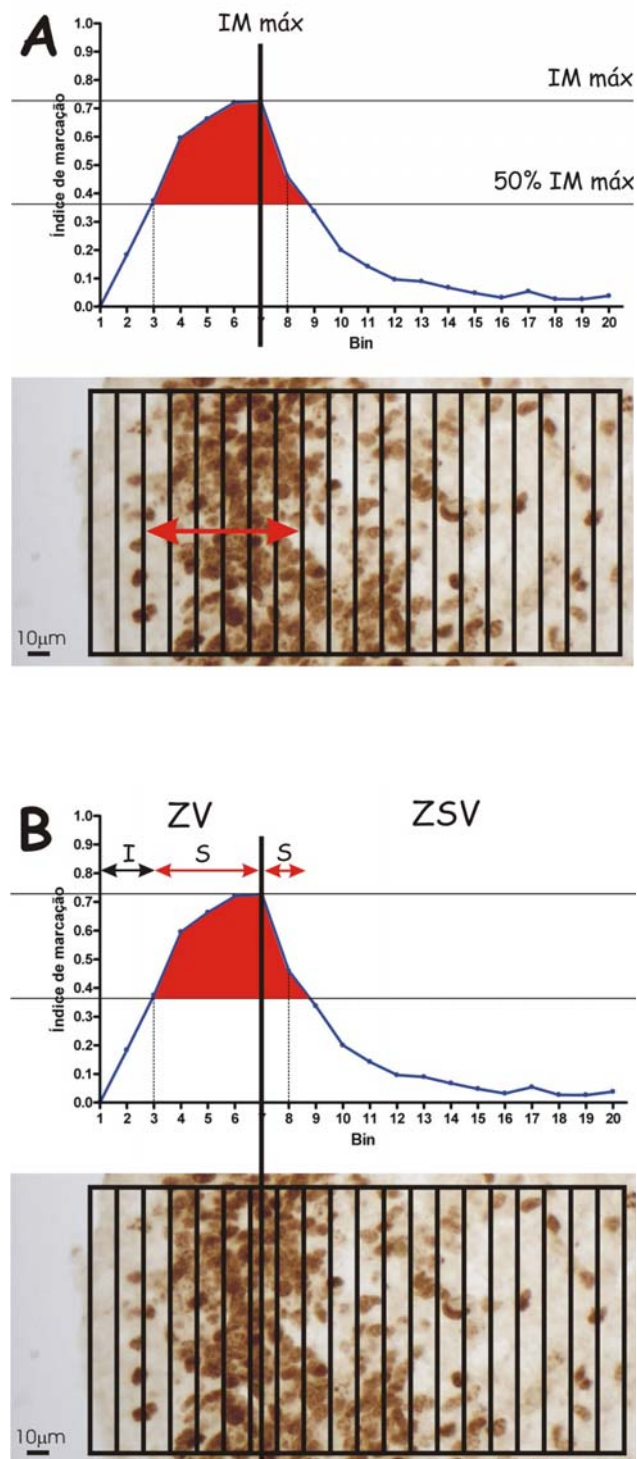


Figura 7: Estimativa da zona de fase S e delimitação das zonas proliferativas. (A) A zona de fase S foi estimada como sendo uma região que contém pelo menos 50% do índice de marcação máximo (IM máx) ilustrado em vermelho. (B) A região que contém as células passando pela fase S (S) da zona ventricular (ZV) foi considerada como sendo a região próxima ao ventrículo lateral, a partir do IM máx que contém a zona de fase S; enquanto a região que contém as células passando pela fase S da zona subventricular (ZSV) foi considerada como sendo a região mais distante do ventrículo lateral, a partir do IM máx. A região I contém as células da ZV passando pelas fases G1, G2 e M do ciclo celular. Essa região foi medida como descrito na figura 4. Barras de escala 10µm.

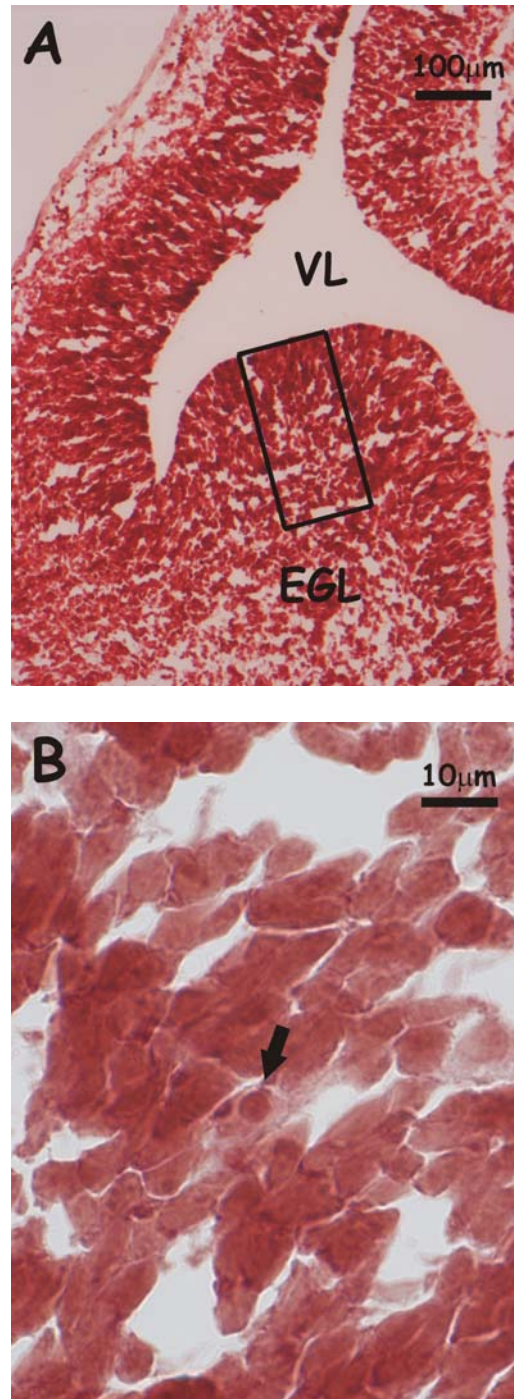


Figura 8: Coloração com vermelho neutro e análise de núcleos condensados. (A) A fotomicrografia de 12 μ m de espessura no plano coronal através do encéfalo de embriões de camundongos E14 na porção rostral corado com vermelho neutro ilustra a área de análise. A área retangular indica o sítio da análise na eminência ganglionar lateral (EGL). Note que uma das bordas da área retangular é contígua à borda do ventrículo lateral (VL). Barra de escala 100 μ m. (B) Fotomicrografia em grande aumento de uma região dentro da área de análise ilustrando um núcleo condensado (seta). Barra de escala 10 μ m.

- Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc). Nas análises de comparações simples entre o grupo controle e o grupo tratado com etanol, foi utilizado o teste t de Mann-Whitney com valor de P *two-tailed* e intervalo de confiança de 95%. Nas análises de comparações entre curvas foram utilizados o teste *Two-way* ANOVA e *post-test* de Bonferroni com valor de P *two-tailed* e intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO ETANOL SOBRE A ESPESSURA DAS EMINÊNCIAS GANGLIONARES

Para estudar o efeito da exposição pré-natal ao etanol sobre a espessura das eminências ganglionares, fêmeas suíças grávidas foram alcoolizadas por gavagem com uma solução de etanol 2g/Kg e sacrificadas 1 hora depois. A dose de etanol administrada foi suficiente para sedar as fêmeas durante, pelo menos, 1 hora após a gavagem. A dosagem de etanol sérico foi, em média, 110g/dl. A análise foi feita nos embriões nos dois níveis rostro-caudais das eminências ganglionares. O tamanho das eminências foi estimado somando-se o tamanho da zona proliferativa (ZP) e da zona do manto, que podem ser distinguidas por contraste devido à diferença na densidade celular (Figura 4). Os resultados da análise são demonstrados na Figura 9.

Na eminência ganglionar medial (EGM) (Figura 9A) a espessura da ZP, zona do manto e da eminência no grupo não exposto ao etanol foi de 423,7 +/- 21,11µm (média +/- erro padrão da média), 357,6 +/- 17,44µm e 781,3 +/- 11,16µm, respectivamente. No grupo exposto ao etanol, o tamanho encontrado foi de 503,7 +/- 32,68µm, 327,3 +/- 30,25µm e 836 +/- 35,87µm, respectivamente. Foi detectada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo exposto ao etanol e o grupo não exposto ao etanol na ZP (p= 0,04). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa tanto na zona do manto quanto no tamanho total da eminência.

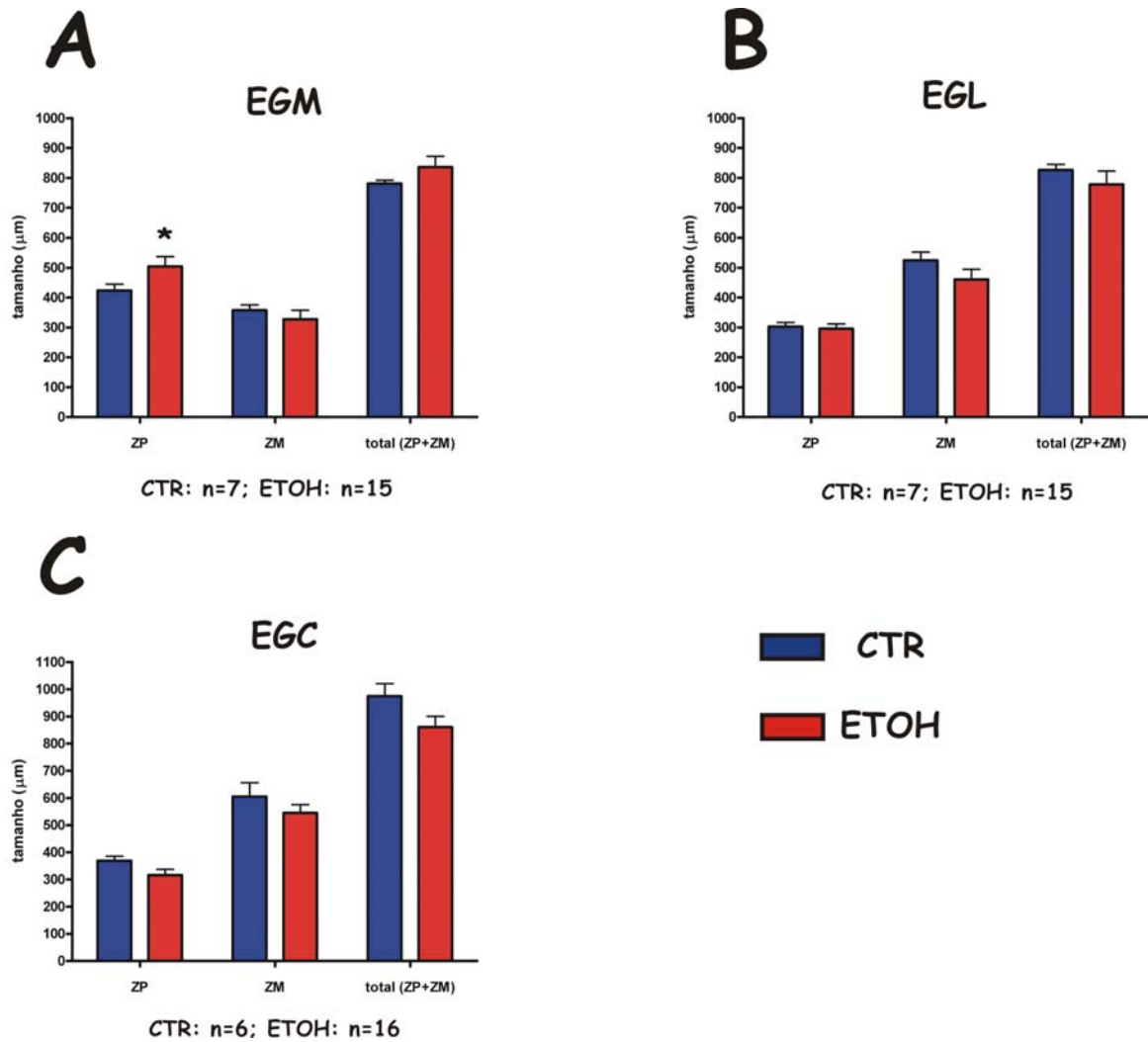


Figura 9: Medida do tamanho da zona proliferativa (ZP), zona do manto (ZM) e da eminência ganglionar (total). As análises foram feitas nos fetos não expostos ao etanol (CTR) e nos fetos expostos ao etanol (ETOH). (A) Análise na eminência ganglionar medial (EGM). (B) Análise na eminência ganglionar lateral (EGL). (C) Análise na eminência ganglionar caudal (EGC). As análises foram feitas em duplicata e o número de embriões analisados (n) é demonstrado em cada caso. O asterisco indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo CTR e o grupo ETOH. A barra indica o erro padrão da média.

Na eminência ganglionar lateral (EGL) (Figura 9B) a espessura da ZP, zona do manto e da eminência no grupo não exposto ao etanol foi de $302,2 \pm 14,41\mu\text{m}$, $524,1 \pm 27,36\mu\text{m}$ e $826,3 \pm 18,45\mu\text{m}$, respectivamente. No grupo exposto ao etanol o tamanho encontrado foi de $295,8 \pm 16,17\mu\text{m}$, $460,4 \pm 33,62\mu\text{m}$ e $777,9 \pm 44,89\mu\text{m}$, respectivamente. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa nas regiões analisadas entre o grupo exposto e não exposto ao etanol.

Na eminência ganglionar caudal (Figura 9C) a espessura da ZP, zona do manto e da eminência no grupo não exposto ao etanol foi de $368,8 \pm 16,69\mu\text{m}$, $605,2 \pm 50,68\mu\text{m}$ e $974 \pm 46,22\mu\text{m}$, respectivamente. No grupo exposto ao etanol o tamanho encontrado foi de $315,9 \pm 21,23\mu\text{m}$, $544,6 \pm 31,03\mu\text{m}$ e $860,5 \pm 39,95\mu\text{m}$, respectivamente. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa nas regiões analisadas entre o grupo exposto e não exposto ao etanol.

Desta forma, observamos que a exposição ao etanol não causa alteração global no tamanho das eminências e de sua zona proliferativa. Somente na EGM houve variação da espessura da ZP dos animais controle ($423,7\mu\text{m}$) em comparação àqueles expostos ao etanol ($503,7\mu\text{m}$). Assim, acreditamos que, na análise de incorporação de BrdU, territórios semelhantes estão sendo utilizados nos dois grupos experimentais.

4.2 EFEITOS DO ETANOL SOBRE O CICLO CELULAR NAS EMINÊNCIAS GANGLIONARES

Para se estudar os efeitos do etanol sobre o ciclo celular foi injetado intraperitonealmente em fêmeas grávidas uma solução de BrdU, um análogo de timidina que é incorporado durante a fase S do ciclo celular, 30 minutos após a

última gavagem, permitido-se um tempo de sobrevivência de 30 minutos. Como observado na Figura 4, após a incorporação e a imunorrevelação do BrdU, é possível identificar 3 faixas: (1) uma faixa pobre em células marcadas próxima ao ventrículo lateral, que corresponde à região da ZV onde as células estão em fase G1, G2 e M; (2), uma faixa de forte incorporação de BrdU adjacente a primeira, que corresponde a região de células da ZV e da ZSV, ambas em fase S; e (3) uma faixa de fraca marcação, que se estende da faixa anterior até a região mais ventral do telencéfalo basal, correspondente a região de células da ZSV, em outras fases do ciclo celular, e às células migratórias, tanto na ZSV quanto na zona do manto. Utilizamos estas divisões aliadas às análises nos “bins” para identificar as alterações no ciclo celular provocadas pelo etanol.

A análise dos efeitos da exposição pré-natal ao etanol sobre o ciclo celular nos fetos demonstrou que, de maneira geral, essa concentração de etanol no sangue é capaz de alterar o ciclo celular nas eminências ganglionares, modificando o número de células na fase S e a extensão do ciclo celular, como detalhado abaixo.

- Análise da marcação por BrdU na EGM.

Na EGM (Figura 10) o número de núcleos imunorreativos para BrdU foi de 241,3 +/- 33,67 no grupo controle e 290 +/- 17 no grupo tratado com etanol (Figura 10A). O número total de núcleos contados, ou seja, imunorreativos para BrdU, somado ao número de núcleos não marcados para BrdU foi de 544 +/- 20,67, no grupo controle, e de 518 +/- 1,92 no grupo tratado com etanol (Figura 10B).

Quando a análise é feita subdividindo-se a eminência em faixas (ou *bins*) e plotando o índice de marcação (IM) em relação a cada faixa, verificamos a existência de uma mudança na curva no grupo exposto ao etanol, a qual foi estatisticamente

significativa ($p < 0,0001$) (Figura 10C). O perfil da curva, obtido por 30 minutos de exposição ao BrdU, representa a distribuição espacial dos núcleos da fase S. Tanto no grupo controle quanto no grupo exposto ao etanol, esta distribuição foi unimodal. O pico da curva que representa o valor mais alto do IM foi a faixa 6, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com etanol. Entretanto, o valor do IM nesta faixa diferiu entre os grupos. O valor mais alto do IM no grupo controle foi de 0,86 e no grupo tratado com etanol foi de 0,93, sugerindo que o etanol pode aumentar a proporção de células em fase S. Para efeito de comparação, as faixas que possuem pelo menos 50% do IM máximo foram arbitrariamente considerados zona de fase S (Figura 7) (BHIDE, 1996). A zona de fase S diferiu entre os grupos. No grupo controle ela se estendeu entre as faixas 3-11 e no grupo exposto ao etanol, entre as faixas 2-10.

Para uma melhor compreensão das análises, a zona ventricular e subventricular foram estimadas (Figura 10D). Devido a grande sobreposição entre essas duas populações celulares (Figura 1), só foi possível distinguir duas populações: (I) células da ZV, passando por G1, G2 e M; e (II) células da ZSV sobrepostas com células da ZV, passando pela fase S do ciclo celular (Figura 4B). O tamanho da região, contendo células da zona ventricular passando por G1, G2 e M no grupo controle, foi de $29,38 \pm 3,12 \mu\text{m}$ e, no grupo tratado com etanol, foi de $23,33 \pm 1,67 \mu\text{m}$, ambos correspondendo à faixa de 1-2. O tamanho da região contendo células da ZV, passando pela fase S, e da ZSV estendeu-se em $461,3 \pm 106,3 \mu\text{m}$ no grupo controle e em $522,1 \pm 21,41 \mu\text{m}$ no grupo exposto ao etanol. Desse modo, todas as análises sobre o ciclo celular na EGM foram feitas dentro das zonas proliferativas.

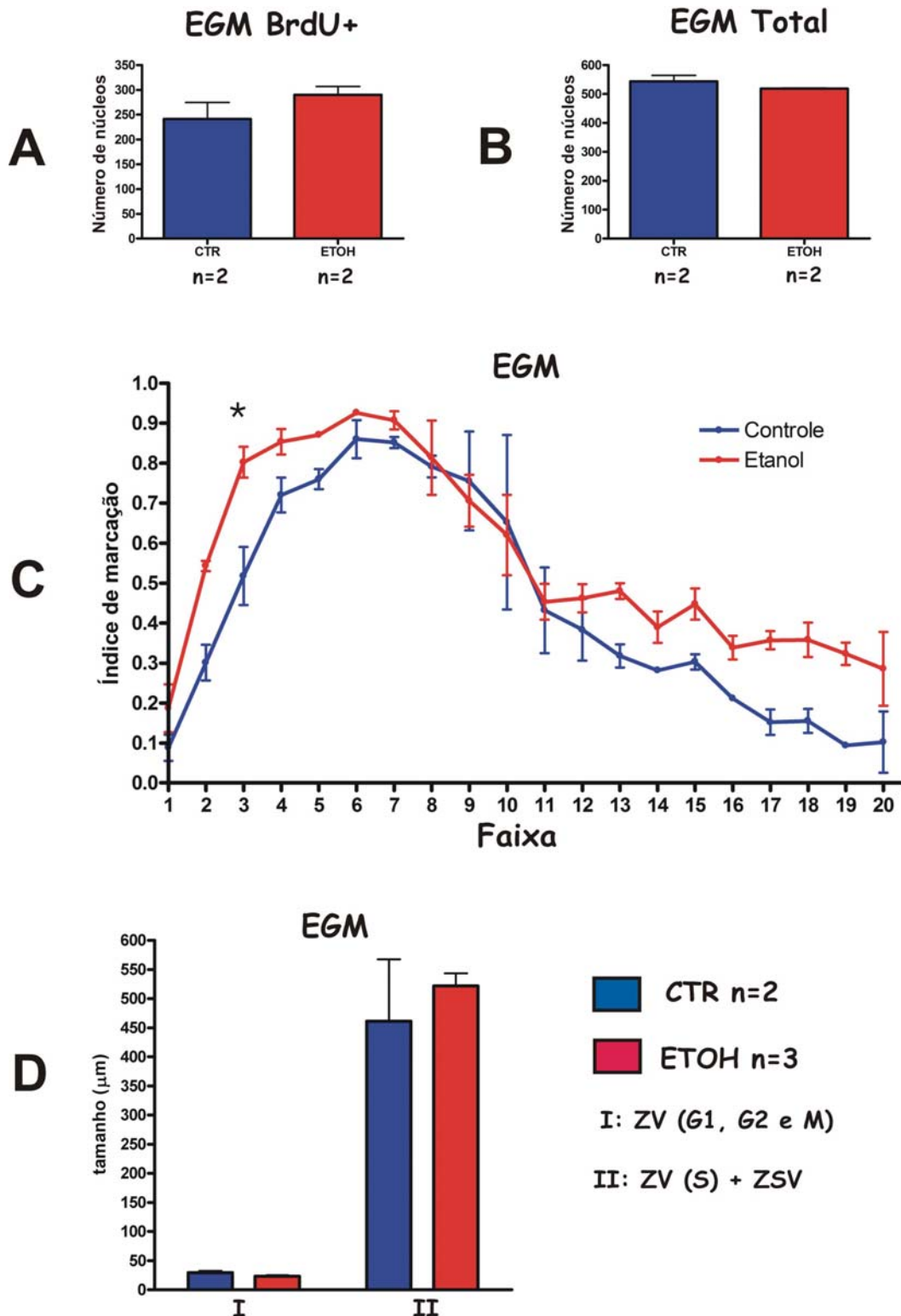


Figura 10: Análise da marcação por BrdU na EGM. As análises foram feitas nos fetos não expostos ao etanol (CTR) e nos fetos expostos ao etanol (ETOH). (A) Contagem do número absoluto de núcleos imunorreativos para BrdU. (B) Contagem do número total de núcleos. (C) Distribuição do índice de marcação para BrdU em relação a distância da borda ventricular. Grupo controle n=2 embriões e grupo etanol n=2 embriões, ambos em triplicata. Two-way ANOVA $p < 0,0001$. O asterisco indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) pelo post test de Bonferroni. (D) Medida do tamanho da zona ventricular (ZV) e da zona subventricular (ZSV). Grupo controle n=2 embriões e grupo etanol n=3 embriões, ambos em triplicata. Em todos os casos a barra indica o erro padrão da média.

Nas faixas iniciais, correspondentes à zona ventricular, verificamos um aumento do índice de marcação no grupo exposto ao etanol, em especial na faixa número 3, onde foi detectada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 10C). Esse resultado pode ser reflexo de um aumento na velocidade de migração nuclear intercinética e/ou de um aumento no número de células ciclando, visto que o IM máximo varia entre os grupos. Desse modo, um maior número de núcleos que incorporaram BrdU, durante a fase S, estaria migrando em direção ao ventrículo para fazer mitose. Nos “bins” finais, correspondentes a região da zona subventricular, foi observada uma tendência ao aumento do índice de marcação, que pode ser devido ao aumento na proliferação celular nesta área.

- Análise da marcação por BrdU na EGL.

Na EGL (Figura 11), o número de núcleos imunorreativos para BrdU foi de 225,8 +/- 58,17 (média +/- erro padrão da média), no grupo controle, e de 236,1 +/- 18,19, no grupo tratado com etanol (Figura 11A). O número total de núcleos contados foi de 539,3 +/- 35, no grupo controle, e de 524,1 +/- 13,97, no grupo tratado com etanol (Figura 11B).

Quando a análise foi feita subdividindo a eminência em faixas e plotando o IM em relação a cada faixa, verificamos a existência de uma mudança na curva no grupo exposto ao etanol, a qual foi estatisticamente significativa ($p=0,0102$) (Figura 11C). A distribuição espacial dos núcleos da fase S foi unimodal no grupo controle e bimodal no grupo tratado com etanol. O pico da curva que representa o maior valor do IM se encontra na faixa 8, no grupo controle, e nas faixas 6 e 8, no grupo tratado com etanol. O valor do IM máximo foi de 0,89 em ambos os grupos. A zona de fase

S no grupo controle se estendeu entre as faixas 4-11 e no grupo tratado com etanol se estendeu entre as faixas 3-11.

O tamanho da região, contendo células da zona ventricular passando por G1, G2 e M, no grupo controle foi de $25 \pm 0 \mu\text{m}$, que corresponde às faixas 1-2, e, no grupo tratado com etanol, foi de $35 \pm 4,41 \mu\text{m}$, que corresponde às faixas 1-3 (Figura 11D). O tamanho da região contendo células da ZV, passando pela fase S, e da ZSV se estendeu em $265,6 \pm 21,88 \mu\text{m}$, no grupo controle, e em $347,5 \pm 12,58 \mu\text{m}$, no grupo exposto ao etanol (Figura 11D). Desse modo, todas as análises sobre o ciclo celular na EGL foram feitas dentro das zonas proliferativas.

Nas faixas iniciais, correspondentes a zona ventricular, verificamos um aumento do índice de marcação no grupo exposto ao etanol (Figura 11C). Esse resultado pode ser reflexo de um aumento na velocidade de migração nuclear intercinética, visto que o IM máximo não varia entre os grupos. Desse modo, um maior número de núcleos que incorporaram BrdU durante a fase S estaria migrando em direção ao ventrículo para fazer mitose. Nos “bins” finais, correspondentes a região da zona subventricular, foi observada uma tendência ao aumento do índice de marcação, que pode ser devido a um aumento na proliferação celular nesta área.

- Análise da marcação por BrdU na EGC.

Na EGC (Figura 12) o número de núcleos imunorreativos para BrdU foi de $186,8 \pm 64,83$, no grupo controle, e de $187 \pm 25,79$, no grupo tratado com etanol (Figura 12A). O número total de núcleos contados foi de $542,3 \pm 9,33$, no grupo controle e de $511,2 \pm 14,87$, no grupo tratado com etanol (Figura 12B).

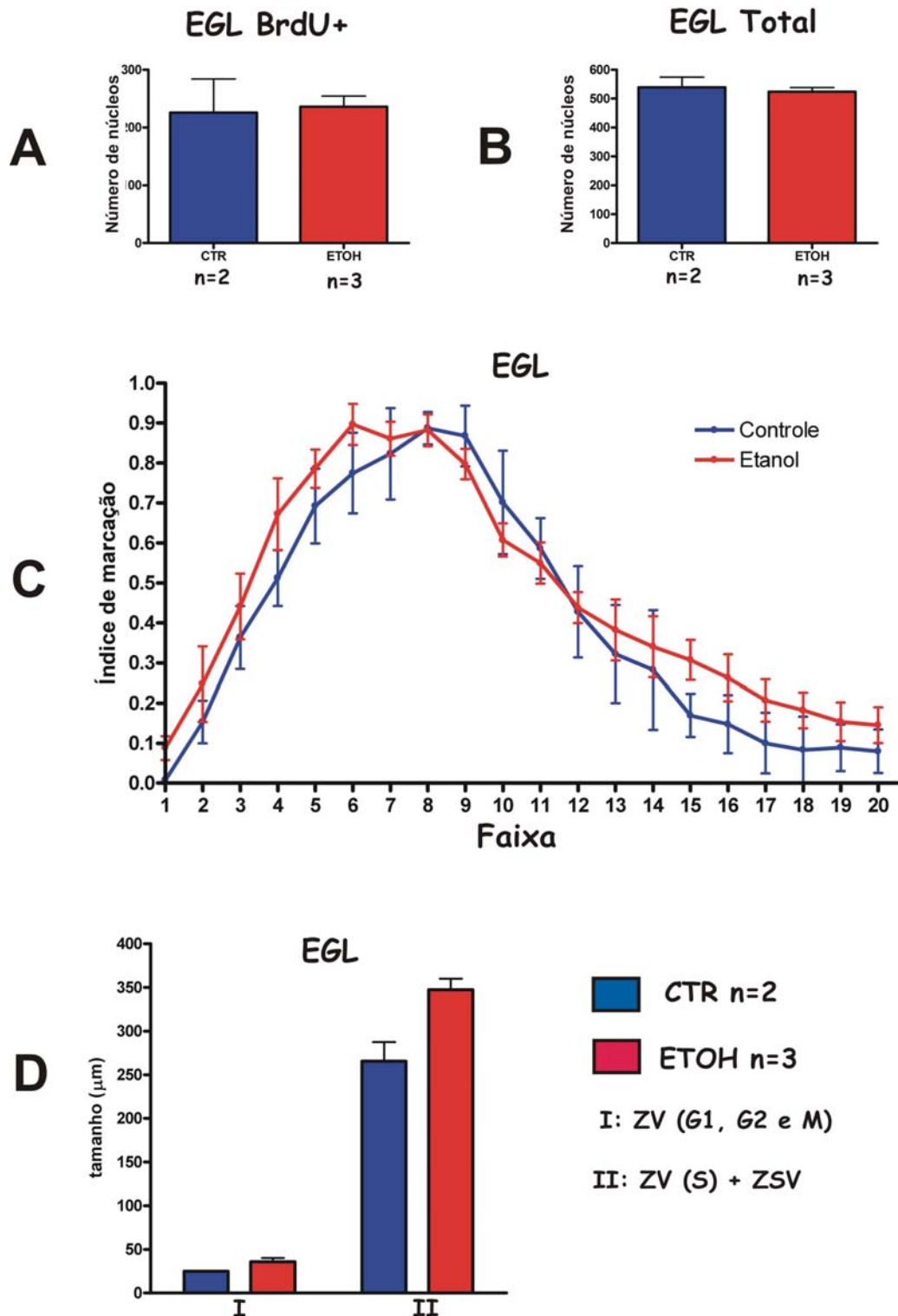


Figura 11: Análise da marcação por BrdU na EGL. As análises foram feitas nos fetos não expostos ao etanol (CTR) e nos fetos expostos ao etanol (ETOH). (A) Contagem do número absoluto de núcleos imunorreativos para BrdU. (B) Contagem do número total de núcleos. (C) Distribuição do índice de marcação para BrdU em relação a distância da borda ventricular. Grupo controle n=2 embriões e grupo etanol n=3 embriões, ambos em triplicata. Two-way ANOVA $p=0,0102$. (D) Medida do tamanho da zona ventricular (ZV) e da zona subventricular (ZSV). Grupo controle n=2 embriões e grupo etanol n=3 embriões, ambos em triplicata. Em todos os casos a barra indica o erro padrão da média.

Quando a análise foi feita subdividindo a eminência em faixas e plotando o IM em relação a cada faixa, verificamos a existência de uma mudança na curva no grupo exposto ao etanol, embora não seja estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 12C). A distribuição espacial dos núcleos da fase S foi unimodal em ambos os grupos. O pico da curva que representa o valor mais alto do IM se encontra na faixa 7, no grupo controle, e, na faixa 5, no grupo tratado com etanol. O valor do IM máximo foi de 0,82, no grupo controle, e de 0,88, no grupo tratado com etanol. A zona de fase S, no grupo controle, se estendeu entre as faixas 3-10 e, no grupo tratado com etanol, se estendeu entre as faixas 3-9.

O tamanho da região contendo células da zona ventricular passando por G1, G2 e M no grupo controle foi de $31,35 \pm 8,75 \mu\text{m}$ e, no grupo tratado com etanol, foi de $25,83 \pm 3,63 \mu\text{m}$, ambos correspondendo às faixas 1-2 (Figura 12D). O tamanho da região contendo células da ZV, passando pela fase S, e da ZSV se estendeu em $337,5 \pm 27,5 \mu\text{m}$ no grupo controle e em $369 \pm 43,11 \mu\text{m}$ no grupo exposto ao etanol (Figura 12D). Desse modo, todas as análises sobre o ciclo celular na EGC foram feitas dentro das zonas proliferativas.

Nas faixas iniciais, correspondentes a zona ventricular, verificamos um aumento do índice de marcação no grupo exposto ao etanol (Figura 12C). Esse resultado pode ser reflexo de um aumento na velocidade de migração nuclear intercinética e/ou no aumento na proporção de células ciclando, visto que o IM máximo varia entre os grupos. Nos “bins” finais, correspondente a região da zona subventricular existe uma grande variabilidade nos grupos estudados, impedindo uma análise mais detalhada da proliferação celular nesta região.

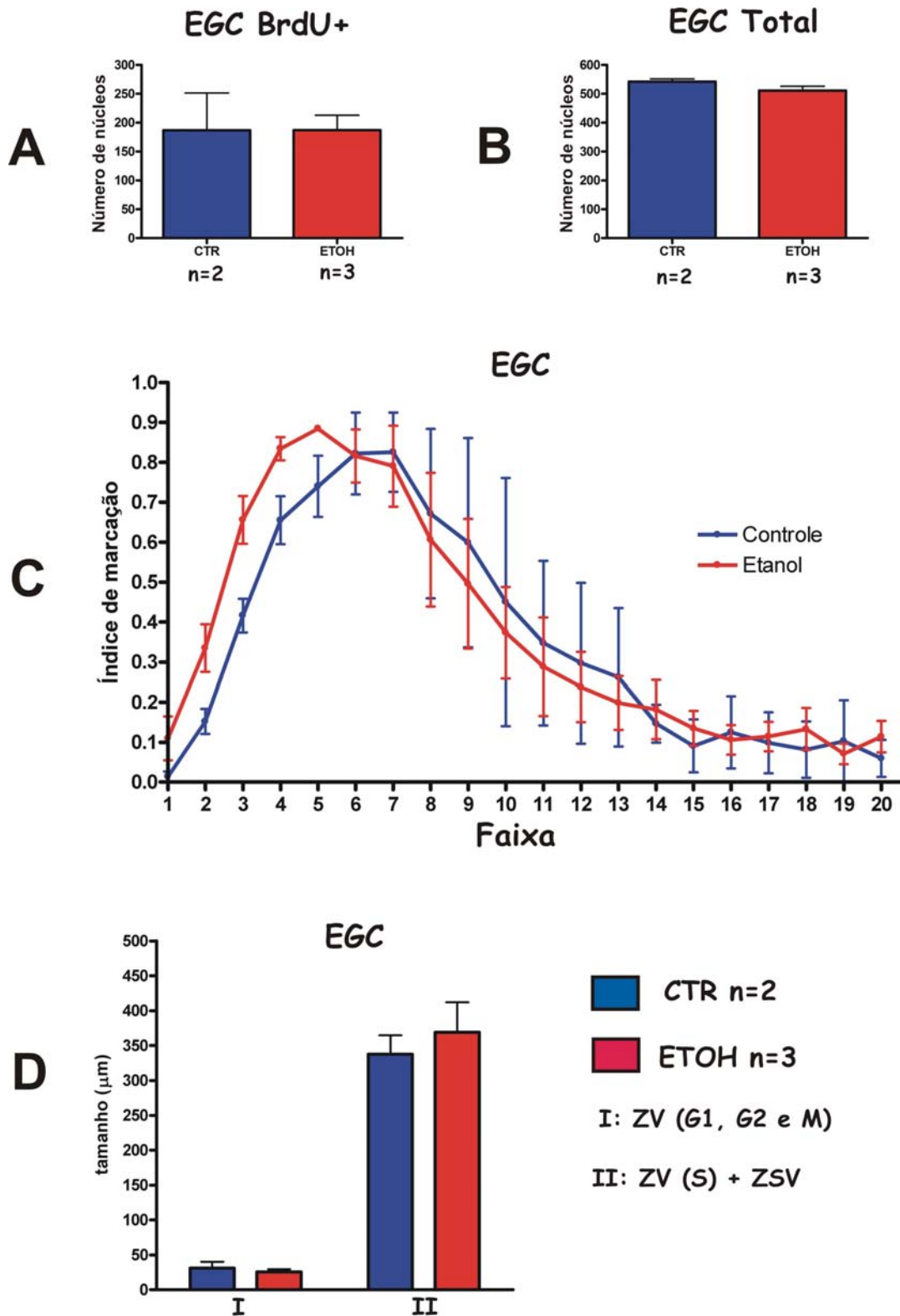


Figura 12: Análise da marcação por BrdU na EGC. As análises foram feitas nos fetos não expostos ao etanol (CTR) e nos fetos expostos ao etanol (ETOH). (A) Contagem do número absoluto de núcleos imunorreativos para BrdU. (B) Contagem do número total de núcleos. (C) Distribuição do índice de marcação para BrdU em relação a distância da borda ventricular. Grupo controle n=2 embriões e grupo etanol n=3 embriões, ambos em triplicata. Two-way ANOVA $p > 0,05$. (D) Medida do tamanho da zona ventricular (ZV) e da zona subventricular (ZSV). Grupo controle n=2 embriões e grupo etanol n=3 embriões, ambos em triplicata. Em todos os casos a barra indica o erro padrão da média.

4.3 EFEITOS DO ETANOL SOBRE A MORTE CELULAR NAS EMINÊNCIAS GANGLIONARES

O número de núcleos condensados, um indicativo de morte celular, foi contado nas eminências ganglionares uma hora após a última gavagem (Figura 13). A contagem do número de núcleos condensados foi feita na mesma região onde foram feitas as análises de ciclo celular (Figura 8).

Na EGM, o número de núcleos condensados foi de $45,05 \pm 14,9/\mu\text{m}^2$ no grupo controle e $84,93 \pm 20,59/\mu\text{m}^2$ no grupo tratado com etanol (Figura 13A). Na EGL, o número de núcleos condensados foi de $34,49 \pm 6,34/\mu\text{m}^2$ no grupo controle e $91,78 \pm 12,00/\mu\text{m}^2$ no grupo tratado com etanol (Figura 13B). Na EGC, o número de núcleos condensados foi de $35,19 \pm 17,26/\mu\text{m}^2$ no grupo controle e $93,85 \pm 9,93/\mu\text{m}^2$ no grupo tratado com etanol (Figura 13C). Foram detectadas diferenças estatisticamente significativa na EGL e na EGC, embora a diferença observada não se apresente de forma robusta, já que os números absolutos são baixos. Em ambos os casos, a exposição ao etanol aumentou de 1 para 2,7 núcleos condensados nessas zonas proliferativas (levando-se consideração a contagem em uma área fixa de $120 \times 240\mu\text{m}^2$ nas zonas proliferativas).

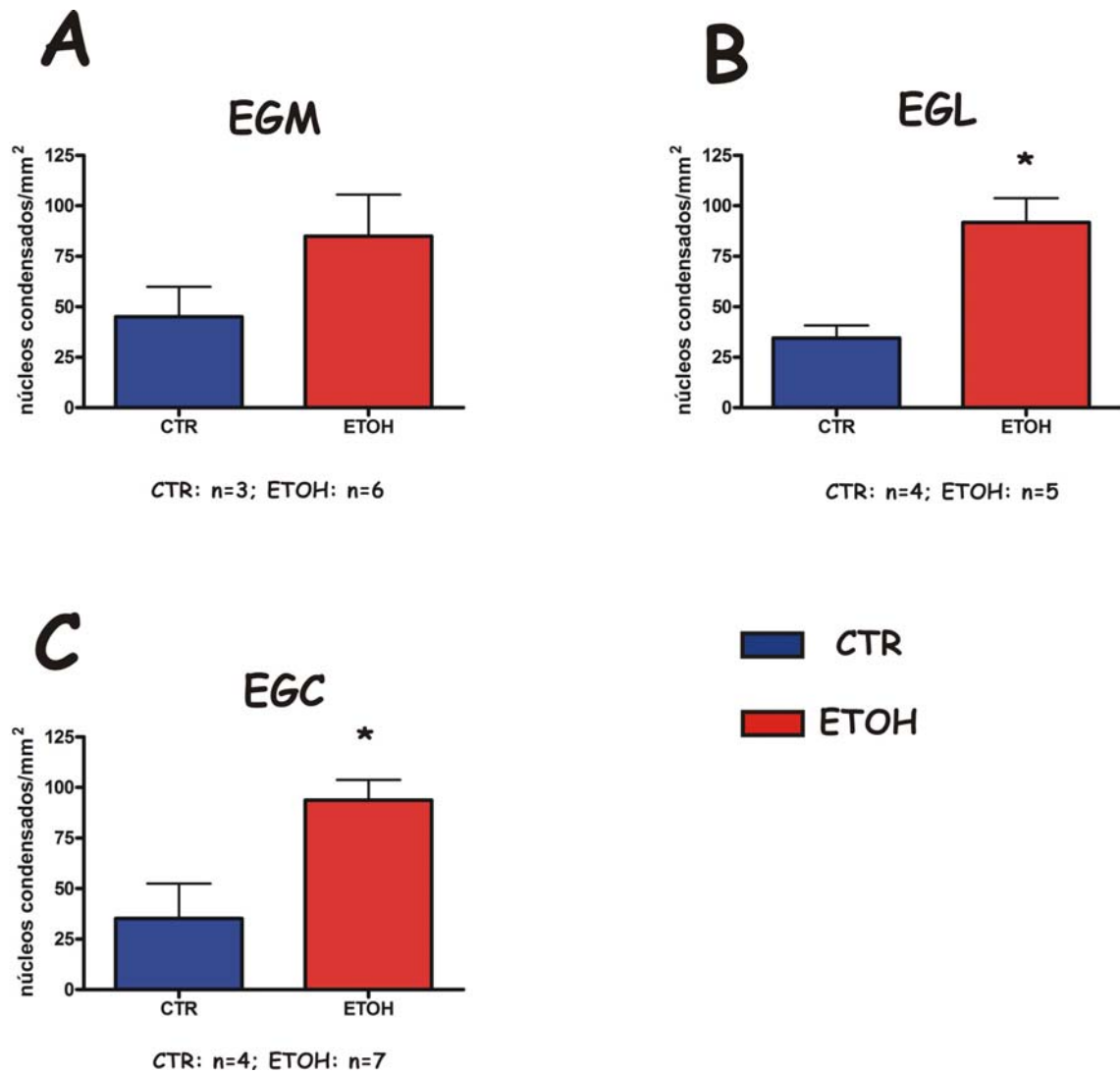


Figura 13: Contagem de núcleos condensados nas eminências ganglionares. Os núcleos foram contados em uma área fixa de $120 \times 240 \mu\text{m}^2$ nas eminências ganglionares. (A) Contagem na eminência ganglionar medial (EGM). (B) Contagem na eminência ganglionar lateral (EGL) (C) Contagem na eminência ganglionar caudal (EGC). O número de embriões analisados (n) é demonstrado em cada caso e as análises foram feitas em triplicata. Asteriscos indicam $p < 0,05$. Em todos os casos a barra indica o erro padrão da média.

5 DISCUSSÃO

A grande maioria dos estudos com etanol envolvendo a síndrome fetal alcoólica, investiga apenas as alterações neurológicas pós-natais. Pouca atenção tem sido dada aos efeitos no encéfalo em formação e, muito menos durante o período de gênese do sistema GABAérgico. Nossa proposta é esclarecer alguns dos possíveis mecanismos que propiciam o aparecimento de distúrbios neurológicos causados pelo álcool em uma janela de tempo relativamente pequena e específica do desenvolvimento embrionário. Investigamos, com mais detalhes, os efeitos provocados pelo etanol em um dos processos ontogênicos progressivos (a proliferação celular) e num dos processos ontogênicos regressivos (a morte celular) dos precursores neuronais nas eminências ganglionares, região do telencéfalo ventral geradora de interneurônios GABAérgicos corticais, durante o pico de geração e migração dessas células.

Nossos experimentos demonstram que a dose de etanol administrada foi suficiente para sedar as fêmeas durante, pelo menos, 1 hora após cada gavagem. Trata-se de um modelo de alcoolismo agudo, cujo padrão e tempo de sedação foram específicos para cada animal, o que também pode ser observado em humanos que ingerem bebidas alcoólicas. Esta via de administração de etanol padroniza, de forma mais segura, o volume/concentração de álcool administrado, já que a dieta alcoólica “*ad libitum*” poderia ser imprecisa num período curto de tratamento (4 dias). A dosagem de etanol sérico foi de, em média, 110mg/dL, concentração esta capaz de alterar a proliferação de neurônios corticais (MILLER e NOWAKOWSKI, 1991; MILLER, 1996; CREWS *et al*, 2006).

5.1 CINÉTICA DO CICLO CELULAR E A DINÂMICA DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NO SNC

Em qualquer tecido em desenvolvimento, a população celular precursora se expande inicialmente para produzir um grande número de novas células precursoras. A população resultante subsequente se depleta através da (1) produção de um elevado número de células filhas, as quais deixam o ciclo celular, diferenciam e adquirem fenótipos de células maduras, e da (2) morte das células ciclantes. Este tipo de padrão de crescimento bifásico assegura a produção de um maior número de células dentro de um intervalo de tempo específico. A ZV cortical, por exemplo, segue este padrão, passando por duas fases de crescimento: uma fase inicial de expansão, durante a qual a maior parte das células filhas retornam ao ciclo celular, e uma fase tardia de depleção celular, onde a maioria das células filhas se diferenciam em neurônios ou glia (SMART, 1976; CAVINESS *et al*, 1995; MILLER e KUHN, 1995; TAKAHASHI *et al*, 1996, 1997).

O uso do marcador de fase S [³H]timidina ([³H]dT) revolucionou a análise da cinética do ciclo celular neuroepitelial por permitir a identificação dos núcleos na fase S e a localização dos núcleos marcados na fase S quando estes passam através das fases G₂, M e G₁ do ciclo celular (SIDMAN *et al*, 1959; ANGEVINE e SIDMAN, 1961; FUJITA e MIYAKE, 1962; SIDMAN, 1970). Tornou-se possível estimar os parâmetros de ciclo celular e o tempo de geração de diferentes tipos celulares através de pulsos de marcação simples ou cumulativos com [³H]dT. O desenvolvimento recente de marcadores de fase S não radioativos, como BrdU e iododeoxiuridina, aumentou a versatilidade desses métodos (MILLER e

NOWAKOWSKI, 1988, 1991; TAKAHASHI *et al*, 1992; HAYES e NOWAKOWSKI, 2000; TARUÍ *et al*, 2005).

Análises sofisticadas de cinética do ciclo celular e de saída do ciclo celular foram executadas pela combinação de métodos de marcação de fase S radioativa e não-radioativa nas ZV e ZSV cortical murina (MILLER e NOWAKOWISK, 1991; CAVINESS *et al*, 1995; HAYES e NOWAKOWSKI, 2000; TAKAHASHI *et al*, 2002; SIEGENTHALER e MILLER, 2005). Estes trabalhos demonstraram que as células da ZV neocortical em fetos de camundongo executam 11 ciclos celulares durante os processos de geração de neurônios neocorticais entre E11 e E17. Durante os 11 ciclos celulares, a duração do ciclo celular aumenta progressivamente, de 8 para 18 horas, devido a um aumento na duração da fase G1 do ciclo celular, de 3 para 12 horas. A probabilidade de que novas células filhas encerrem o ciclo celular (chamado de Q) aumenta durante o período da neurogênese cortical (MILLER, 1993, 1999b; MILLER e KUHN, 1995; TAKAHASHI *et al*, 1999). Ela está próxima de zero para o ciclo celular 1 (em E11 de camundongo) e próximo de 100% para o ciclo celular 11 (entre E16 e E17). Cada ciclo celular tem um valor específico de Q e um tempo de duração do ciclo celular associado a ele. Esses dois parâmetros aumentam sistematicamente durante a progressão dos 11 ciclos celulares.

A neurogênese através do córtex como um todo não ocorre simultaneamente; ela se processa por vários gradientes espaço-temporais (SMART, 1961; SMART e MCSHERRY, 1982; MILLER, 1988a; BAYER e ALTMAN, 1991). Os gradientes transversos refletem os gradientes na cinética do ciclo celular, especialmente o valor de Q na ZV cortical (CAVINESS *et al*, 2000, 2003; TARUI *et al*, 2005). Desse modo, as células da ZV são distribuídas ao longo de um *continuum* espacial de parâmetros de ciclo celular e Q. As células da ZV localizadas em posições rostro-laterais são

mais avançadas do que aquelas em posições caudo-mediais no que diz respeito ao tamanho do ciclo celular e valores de Q. A neurogênese neocortical também procede ao longo da dimensão radial, uma característica comum em estruturas laminares no sistema nervoso. Desse modo, os neurônios são gerados de dentro para fora (*inside-out*): os neurônios das camadas mais profundas são gerados mais inicialmente do que os neurônios das camadas mais superficiais (ANGEVINE e SIDMAN, 1961; BERRY *et al*, 1964; BERRY e ROGERS, 1965; CAVINESS, 1982; MILLER, 1985).

Os neurônios corticais não são gerados somente nas zonas proliferativas neocorticais, mas também a partir de células proliferativas na eminência ganglionar. A ZV neocortical é a fonte de neurônios de projeção glutamatérgicos neocorticais, os quais constituem de 70-90% de todos os neurônios neocorticais (PETERS *et al*, 1985; REN *et al*, 1992; BEAULIEU, 1993). Em roedores, a maior parte dos neurônios de circuitaria local GABAérgicos do córtex cerebral, os quais constituem 10-30% de todos os neurônios neocorticais, são produzidos nas EGM e EGC do telencéfalo basal (ANDERSON *et al*, 1997a; TAMAMAKI *et al*, 1997; LAVDAS *et al*, 1999; POWELL *et al*, 2001; NERY *et al*, 2002; ANG *et al*, 2003). Esses neurônios de circuitaria local chegam ao córtex através das vias de migração tangencial. Em primatas, entretanto, aparentemente a maior parte dos neurônios de circuitaria local GABAérgicos do córtex cerebral derivam das ZV neocorticais e somente uma parcela é gerada nas eminências ganglionares (LETINIC *et al*, 2002). Embora os neurônios de projeção e os de circuitaria local neocorticais sejam produzidos em diferentes locais, aparentemente os tipos neuronais localizados na mesma camada cortical são produzidos no mesmo dia, pelo menos em roedores (MILLER, 1985,

1988b, 1999; FAIRÉN *et al*, 1986; COBAS e FAIRÉN, 1988; VALCANIS e TAN, 2003).

Diferente do córtex cerebral, o corpo estriado não é uma estrutura laminar. Ele consiste em núcleo caudado e putamen, sendo o centro de *input* dos núcleos da base. Cerca de 90% dos neurônios neostriatais são neurônios de projeção GABAérgicos e as células remanescentes são neurônios de circuitaria local colinérgicas (GERFEN e WILSON, 1996). Os neurônios de projeção neostriatais são gerados na EGL (HEWITT, 1958; SMART, 1976; SMART e STURROCK, 1979; LAMMERS *et al*, 1980; FENTRESS *et al*, 1981), e os de circuitaria local, na EGM e na área entopeduncular anterior/preóptica (MARIN *et al*, 2000).

Dois estudos usando métodos de marcação de fase S compararam os parâmetros de ciclo celular e de saída do ciclo celular das zonas proliferativas da EGL, semelhantemente àqueles usados nas zonas proliferativas neocorticais (BHIDE, 1996; SHETH e BHIDE, 1997). O ciclo celular foi mais longo e os valores de Q foram maiores na EGL de camundongos em E11 e E12, quando comparados às zonas proliferativas neocorticais. A neurogênese neostriatal também segue gradientes espaço-temporais (FERNANDEZ *et al*, 1979; MARCHAND e LAJOIE, 1986; BAYE e ALTMAN, 1987) que são menos sistemáticos do que os gradientes transversos e radiais que definem a neurogênese neocortical. De fato, gradientes de neurogênese são difíceis de ser definidos em estruturas não laminares, como o estriado (BAYER e ALTMAN, 1987).

5.2 CINÉTICA DO CICLO CELULAR E OS EFEITOS PROVOCADOS PELO ETANOL

O etanol não afeta os padrões de migração nuclear intercinética na ZV cortical (KENNEDY e ELLIOTT, 1985; MILLER, 1989). Entretanto, o etanol pode afetar o tempo que as células da ZV passam através do ciclo celular. Por exemplo, na ZV neocortical de ratos E21 o tamanho do ciclo celular é aumentado de 26-29% (MILLER e NOWAKOWSKI, 1991). Esse aumento tem um efeito negativo direto no número de células produzidas na ZV. Esses efeitos provocados pelo etanol, no entanto, não são os mesmos para todas as populações proliferativas, já que o tempo de duração do ciclo celular na ZSV neocortical não é afetada por exposições moderadas ao etanol (MILLER e NOWAKOWISK, 1991). O aumento induzido pelo etanol na duração do ciclo celular é resultado, primariamente, de um aumento na duração da fase G1. Um aumento na duração do ciclo celular também é evidente na camada granular externa do cerebelo (BORGES e LEWIS, 1983).

Várias proteínas relacionadas ao ciclo celular são afetadas pelo etanol: a expressão de ciclina A (uma reguladora das fases S e G2), ciclina D1, e cdk2 (proteínas que regulam a progressão das células de G1 para S) são reduzidas pela exposição ao etanol (LI *et al*, 2001, 2002; SIEGENTHALER e MILLER, 2005a). A expressão cerebelar de ciclina D2, cdk4 e cdk6 (reguladores de G1) não são afetados pelo etanol (LI *et al*, 2002). Em contraste, a p27 (uma proteína envolvida no movimento das células de G1 para fora do ciclo celular) é deprimida pelo etanol na ZV de explantes corticais (SIEGENTHALER e MILLER, 2005a) e no cerebelo de rato em desenvolvimento (LI *et al*, 2002). Desse modo, os efeitos do etanol nas proteínas relacionadas ao ciclo celular não somente corroboram, como também providenciam

um mecanismo de aumento induzido pelo etanol na duração do ciclo celular, saída do ciclo celular e, conseqüentemente, decréscimo na fração de crescimento (veja adiante).

A análise do ciclo celular é um parâmetro importante para determinar o crescimento de uma população de células. No entanto, além da cinética do ciclo celular, a produção de novas células pode ser determinada também por parâmetros populacionais: a fração de crescimento, a proporção de células que encerram o ciclo celular e a fração que deixa o ciclo celular.

A fração de crescimento é a proporção da população total de células que está ativamente ciclando. De modo geral, a fração de crescimento na parede cerebral estende-se por todo o período de neurogênese neocortical (MILLER e KUHN, 1995; TAKAHASHI *et al*, 1995, 1996). Embora não exista diferença induzida pelo etanol na fração de crescimento no início deste período, conforme a geração neuronal se processa, diferenças significativas começam a aparecer. O etanol provoca um aumento na fração de crescimento devido, em grande parte, ao aumento induzido pelo etanol na ZSV cortical. Tanto a fração de crescimento, quanto o número de células na ZSV são aumentados pelo etanol (MILLER e NOWAKOWSKI, 1991; MILLER, 1989). A fração de crescimento na ZV cortical não é afetada pelo etanol *in vivo* (MILLER e NOWAKOWSKI, 1991), mas significativamente reduzida na ZV de preparações organotípicas de secções corticais. Os efeitos do aumento na fração de crescimento são acentuados quando a ZSV torna-se a zona proliferativa neocortical majoritária no período pré-natal.

Um segundo fator determinante é dado pelo número de células que param de ciclar, ou seja, que entram em um processo de quiescência celular (G0). Após passarem pela fase M, as células podem re-entrar no ciclo celular ou sair do ciclo

celular. O número de células que param de ciclar pode ser determinado traçando a proporção de células que incorporaram um precursor de DNA durante a fase S, por exemplo BrdU, relativa ao total de células ciclando, por exemplo, células expressando Ki-67 (CHENN e WALSH, 2002, 2003; SIEGENTHALER e MILLER, 2005a; 2005b). De acordo com esta hipótese, Siegenthaler e Miller (2005a) demonstraram que o etanol aumenta o número de células que param de ciclar em explantes corticais em cultura.

A terceira característica que contribui para a produção neuronal é a fração que deixa o ciclo celular. Enquanto a população que pára de ciclar ainda permanece nas zonas proliferativas, as células que deixam o ciclo celular migram para as suas regiões de destino. O etanol não afeta a população que deixa o ciclo celular (MILLER, 1993). Como o etanol pode afetar o número de células que param de ciclar, a falta de um aumento na fração que deixa o ciclo celular implica que o etanol induz as células pós-mitóticas a permanecerem nas zonas proliferativas corticais por um tempo maior antes de começarem a migrar. Este fato pode levar ao aparecimento de neurônios em camadas erradas e/ou causar ectopias.

5.3 ACELERAÇÃO DO CICLO CELULAR OU AUMENTO DO NÚMERO DE CÉLULAS CICLANDO?

Em nosso modelo experimental verificamos que a exposição pré-natal ao etanol pode provocar diferentes efeitos que variam de acordo com a região estudada. Esses efeitos sobre o ciclo celular nos fetos demonstrou que, de maneira geral, o etanol é capaz de alterar o ciclo celular nas eminências ganglionares modificando o número de células na fase S e a velocidade do ciclo celular.

O perfil da curva obtido por 30 minutos de exposição ao BrdU representa a distribuição espacial dos núcleos da fase S. Na maioria dos casos, esta distribuição foi unimodal, apresentando-se de forma bimodal em apenas um caso: no grupo tratado com etanol da EGL. Para efeitos de comparação, as faixas que possuem pelo menos 50% do IM máximo foram arbitrariamente considerados zona de fase S (Figura 7). A zona de fase S diferiu entre as diferentes porções rostro-caudais e entre os grupos estudados (resumido na Tabela 1).

		ZV (G1+G2+M)	IM máximo	Zona de fase S	ZV (S)	ZV	ZSV
EGM	CTR	1-2	6	3-11	3-6	1-6	6-20
	ETOH	1-2	6	2-10	2-6	1-6	6-20
EGL	CTR	1-2	8	4-11	4-8	1-8	8-20
	ETOH	1-3	6 e 8	3-11	3-6 ou 3-8	1-6 ou 1-8	6-20 ou 8-20
EGC	CTR	1-2	7	3-10	3-7	1-7	7-20
	ETOH	1-2	5	3-9	3-5	1-5	5-20

Tabela 1: Estimativa hipotética da zona ventricular (ZV) e da zona subventricular (ZSV) nos diferentes níveis rostro-caudais das eminências ganglionares. Os resultados são descritos em faixas, com cada faixa medindo 12 X 120 μ m e sendo a faixa 1 adjacente ao ventrículo lateral, como descrito nos materiais e métodos. A região contendo as células da ZV passando pela fase S (ZV (S)) do ciclo celular foi arbitrariamente considerado como sendo a região a partir do índice de marcação (IM) máximo que contém a zona de fase S mais próxima do ventrículo lateral.

Para uma melhor compreensão das análises, a ZV e ZSV foi estimada (Figura 14). Para fins comparativos, a região mais próxima do ventrículo lateral, a partir do IM máximo que contém a zona de fase S, foi arbitrariamente considerada uma região contendo células da ZV passando pela fase S, e, a região mais distante do ventrículo lateral, a partir do IM máximo que contém a zona de fase S, foi arbitrariamente considerada uma região contendo a zona de fase S da ZSV. Desse modo, juntando os resultados obtidos com a medida da região contendo as células

da ZV passando por G1, G2 e M (Figura 10, 11 e 12D) com a estimativa do tamanho da região que contém as células da ZV passando pela fase S, podemos estimar o tamanho da ZV e, por conseguinte, o tamanho da ZSV. A estimativa da ZV e da ZSV nos diferentes níveis rostro-caudal nos diferentes grupos experimentais é demonstrada na Figura 14 e resumida na Tabela 1.

Na EGM verificamos que o tamanho da zona ventricular não varia entre os grupos, estando entre as faixas 1-6 (Tabela 1 e Figura 14A). O valor do IM máximo nesta região variou. O valor mais elevado do IM no grupo controle foi de 0,86 e no grupo tratado com etanol foi de 0,93. Estes valores significam que cerca de 86% dos núcleos no grupo controle e 93% dos núcleos no grupo exposto ao etanol estão na fase S na região de mais alta densidade de núcleos em fase S, sugerindo que o etanol pode aumentar a proporção de células em fase S nesta região. Se o etanol não estiver aumentando a velocidade de migração nuclear intercinética na ZV, o IM deveria se manter proporcional na ZV e a curva deveria ser paralela entre os grupos. Não foi o que verificamos na ZV da EGM (Figura 14A). Nesta região houve uma diferença no perfil das curvas, estatisticamente significativa na faixa 3, que pode ser devido a um aumento na migração nuclear intercinética nesta área. Assim, sugerimos que o etanol na porção rostral da EGM está aumentando a proporção de células ciclando e aumentando a velocidade do ciclo celular, visto que a migração nuclear intercinética está aumentada e o tamanho da ZV é semelhante entre os grupos. Na ZSV verificamos que a exposição ao etanol provoca uma tendência a um aumento do índice de marcação sobretudo a partir da faixa 11 (Figura 14A). Desse modo, acreditamos que nesta região a exposição ao etanol provoca um aumento no número de células ciclando.

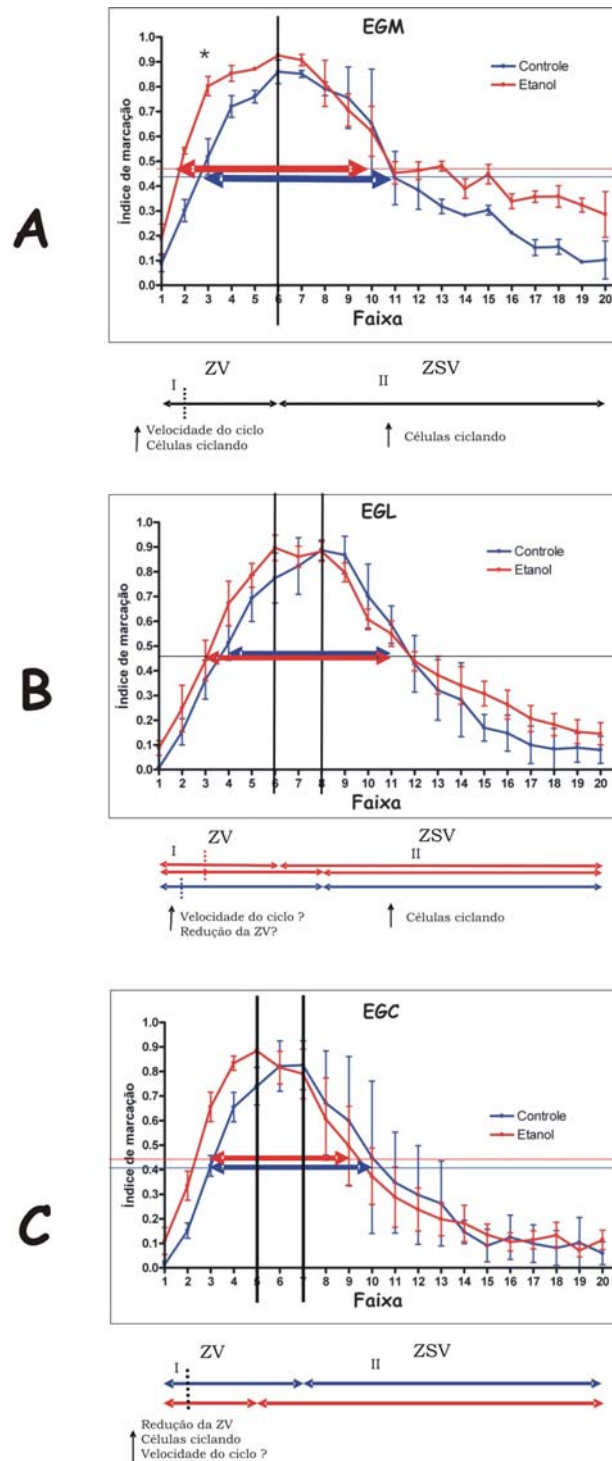


Figura 14. Alterações no ciclo celular provocadas pelo etanol nos diferentes níveis rostro-caudais. As setas duplas nas curvas indicam a extensão da zona de fase S nos diferentes grupos experimentais, sendo a seta azul relativa ao grupo controle e a seta vermelha relativa ao grupo exposto ao etanol. A linha vertical indica o índice de marcação máximo. As setas duplas abaixo das curvas indicam a extensão da zona ventricular (ZV) e da ZSV (zona subventricular) nos diferentes grupos experimentais: azul para o controle, vermelho para o grupo exposto ao etanol e preto quando existe uma coincidência entre os grupos. A região I e II corresponde àquelas medidas das Figuras 10, 11 e 12D. A linha vertical pontilhada indica a separação entre essas duas regiões. (A) Alterações na eminência ganglionar medial (EGM). (B) Alterações na eminência ganglionar lateral (EGL). (C) Alterações na eminência ganglionar caudal (EGC).

Na EGL observamos que a curva apresentou-se de forma bimodal no grupo tratado com etanol (Figura 14B). Assim, neste grupo experimental, dois picos contendo um IM máximo foram encontrados, impedindo uma inferência precisa sobre o tamanho da ZV neste grupo experimental e, desse modo, prejudicando nossas análises acerca do padrão migratório intercinético. Entretanto, verificamos que o IM máximo não variou entre os grupos experimentais e, desse modo, o etanol não induziu um aumento na proporção de células passando pela fase S na ZV. Além disso, na ZSV verificamos que a exposição ao etanol provoca uma tendência a um aumento do índice de marcação sobretudo a partir da faixa 12 (Figura 14B). Desse modo, acreditamos que nesta região a exposição ao etanol provoca um aumento no número de células ciclando na ZSV.

Na EGC, diferente da EGM, verificamos que a exposição ao etanol diminui a espessura da ZV. No grupo controle a ZV está compreendida entre as faixas 1-7 e, no grupo exposto ao etanol, entre as faixas 1-5 (Tabela 1 e Figura 14C). Além dessa diferença, o IM máximo variou entre os grupos: no grupo controle o IM foi de 0,82 e, no grupo tratado com etanol, de 0,88. Devido ao fato do tamanho da ZV ser menor no grupo exposto ao etanol, não sabemos se nesta região o etanol poderia estar induzindo uma aceleração do ciclo celular, pois o aumento do IM pode ser reflexo de um maior empacotamento de células passando pela fase S na ZV. Na ZSV verificamos que não existe diferença entre as curvas e desse modo, nesta região, o etanol não altera a proporção de células ciclando (Figura 14C). Assim, as maiores mudanças provocadas pelo etanol na EGC ocorrem na ZV, onde a exposição ao etanol provoca uma redução desta zona proliferativa e um aumento na proporção de células passando pela fase S nesta região.

Em todos os casos um estudo mais detalhado com experimentos de marcação cumulativa de BrdU são necessários para se determinar a extensão da duração do ciclo celular e das fases que o compõem, como nos estudos que descreveram a duração do ciclo celular no neuroepitélio cortical (TAKAHASHI *et al*, 1992 e 1993) e ganglionar (BHIDE, 1999). De qualquer maneira, verificamos que o etanol pode aumentar tanto a proporção de células ciclando na ZV e na ZSV na maioria dos casos, quanto a velocidade do ciclo celular na ZV na porção rostral da EGM. O aumento na proporção de células ciclando e na redução do ciclo celular na ZV ocorre de maneira oposta aos resultados obtidos por Miller no neuroepitélio cortical, onde foi visto que a exposição pré-natal ao etanol reduz o número total de células ciclando na ZV e aumenta a duração do ciclo celular (MILLER, 1989; MILLER e NOWAKOWSKI, 1991). O aumento na proporção de células ciclando na ZSV ganglionar ocorre da mesma maneira que na ZSV cortical nos embriões expostos ao etanol (MILLER, 1989; MILLER e NOWAKOWSKI, 1991).

O aumento tanto da proporção de células na ZV e na ZSV ganglionar quanto da velocidade do ciclo celular na ZV na EGM podem aumentar o número de células formadas na eminência ganglionar. Devido à aceleração do ciclo celular, células com alterações no genoma podem ser formadas, pois os mecanismos de ponto de checagem (ou *checkpoint*) do ciclo celular podem estar alterados. As populações de células com defeito no ponto de checagem freqüentemente acumulam mutações devido ao mau funcionamento ocasional na replicação do DNA, no reparo de DNA ou na formação de fusos. Algumas dessas mutações podem promover o desenvolvimento de câncer, formação de células aneuplóides ou induzir a morte celular (ALBERTS *et al*, 2004). Essas células podem migrar para locais inadequados, podendo se estabelecer em camadas corticais inadequadas e/ou

formar heterotopias. Como os corpos celulares estão distribuídos em locais inapropriados eles vão se integrar na rede sináptica incorretamente (AL-RABIAI e MILLER, 1989). Conseqüentemente, anormalidades na atividade e na função cortical podem ocorrer (VINGAN *et al*, 1986; MILLER e DOW-EDWARDS, 1988, 1993). As conexões sinápticas imperfeitas devido às heterotopias podem causar diversos problemas, como a epilepsia (CHEVASSUS-AU-LOUIS e REPRESA, 1999), um sintoma neurológico prevalente em crianças com SAF (BURD *et al*, 2003).

5.4 MORTE CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO SNC

Durante os anos de 1940-1950, Victor Hamburguer, Rita Levi-Montalcini e Stanley Cohen conduziram os estudos pioneiros nos mecanismos que controlam a morte celular, culminando com a identificação do fator de crescimento do nervo (NGF) (COHEN e LEVI-MONTALCINI, 1957). Estudos na função do NGF geraram a teoria neurotrófica, a qual postula que a sobrevivência neuronal depende da competição de por uma quantidade limitada de fatores tróficos liberados pelos alvos sinápticos (OPPENHEIM, 1991). Entretanto, a morte celular pode afetar populações proliferantes, as quais não apresentam contatos sinápticos nos estágios iniciais de desenvolvimento. Desse modo, o que faz com que as células nas zonas proliferativas morram?

James Voyvodic sugere que a morte celular nas zonas proliferativas possa atuar de maneira semelhante à seleção natural Darwiniana, eliminando todas as células não adaptadas (VOYVODIC, 1996). Desse modo, células com erros na replicação do DNA ou na diferenciação celular, por exemplo, podem ser sinalizadas de algum modo a entrar em processo de morte celular ou automaticamente entrar

em processo de morte celular. Uma outra possibilidade sugerida pelo autor é que a morte celular nas zonas proliferativas possa ser resultado de um suprimento inadequado de fatores exógenos de sobrevivência, similar a noção de dependência de fator trófico liberado pelos alvos associados com a formação das sinapses. Assim, a sobrevivência de qualquer célula em particular depende do local que a células se encontra e se esse local possui todos os fatores tróficos necessários para a sobrevivência daquela célula em particular. Além disso, interações competitivas com outras células similares podem estar presentes se o suprimento de fator trófico é limitado (VOYVODIC, 1996).

A avaliação direta dos cromossomos em células se dividindo pode ser feita pelo cariótipo espectral (SKY) que usa marcadores fluorescentes para identificar cada cromossomo. Esta técnica revelou que uma grande fração de células progenitoras neurais apresentam anormalidades cromossomais. Observou-se que 1/3 das células progenitoras neurais ganham ou perdem pelo menos um dos 40 cromossomos em camundongos (REHEN *et al*, 2001). A aneuploidia também é detectada no córtex cerebral adulto, usando hibridização interfásica *in situ* fluorescente (FISH) para visualizar cromossomos individuais. No córtex cerebral de camundongos machos adultos, FISH para o cromossomo X e Y demonstrou que aproximadamente 1% dos neurônios ganham ou perdem um cromossomo sexual (REHEN *et al*, 2001). Este resultado indica que pelo menos uma fração de células aneuplóides é produzida durante a neurogênese e sobrevive no adulto. Teoricamente a porcentagem total de neurônios aneuplóides é maior do que 1%, assumindo que a taxa de ganho ou de perda é similar para todos os cromossomos (KAUSHAL *et al*, 2003), embora estudos mais detalhados sejam requeridos para comprovar esta hipótese.

Embora algumas células aneuplóides sobrevivam, a aneuploidia pode contribuir para uma significativa proporção de morte celular durante a neurogênese. A morte celular é um destino comum para células aneuplóides. Em cânceres, muitas das células que estão morrendo possuem seu genoma alterado. Além disso, a alta quantidade de morte celular nas zonas proliferativas suporta a idéia de um processo de seleção contra anormalidades genéticas indesejadas.

Nossos resultados demonstram que a exposição pré-natal ao etanol pode aumentar a morte celular em duas regiões: na EGL e na EGC. Acreditamos que esse aumento no número de núcleos condensados, um indicativo de morte celular, não seja capaz de provocar mudanças muito profundas nestas regiões, visto que a exposição ao etanol aumenta de 1 para 2,7 núcleos condensados nessas zonas proliferativas (levando-se em consideração a contagem em uma área fixa de $120 \times 240 \mu\text{m}^2$ nas zonas proliferativas). Entretanto, este número pode refletir que possíveis alterações genéticas provocadas pela aceleração do ciclo celular e aumento no número de células ciclantes possam estar ocorrendo, visto que essas alterações genéticas ocorrem em uma frequência baixa. De maneira interessante, foi verificado que o etanol pode induzir aneuploidias em óvulos fertilizados de camundongo (O'NEILL e KAUFMAN, 1987). Investigações futuras poderão ser direcionadas ao estudo de possíveis alterações genéticas provocadas pelo etanol no nosso modelo experimental.

Nossos resultados contrastam com aqueles de Blaschke e colaboradores (1996), em que os autores demonstram que no córtex cerebral em E14 até 70% dos neurônios estão em processo de morte. Os métodos utilizados por estes autores (marcação *in situ* para ISEL, que identifica DNA nuclear fragmentado) são, no

entanto, mais sensíveis do que o utilizado por nós. Assim, nossos dados podem estar subestimados.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que a administração de etanol por gavagem em uma janela de tempo relativamente pequena e específica do desenvolvimento embrionário é capaz de alterar o ciclo e a morte celular nas eminências ganglionares em camundongos.

A exposição ao etanol não causa uma alteração global no tamanho das eminências ganglionares e de sua zona proliferativa no nosso modelo experimental. Somente na EGM houve variação da espessura da ZP dos animais controle comparados àqueles expostos ao etanol.

Verificamos que a exposição pré-natal ao etanol pode provocar diferentes efeitos sobre a população de células proliferativas, que variam de acordo com a região estudada. Esses efeitos sobre o ciclo celular nos fetos demonstraram que, de maneira geral, o etanol é capaz de alterar o ciclo celular nas eminências ganglionares modificando o número de células na fase S e a velocidade do ciclo celular. Este aumento anormal do número de células formadas nas eminências ganglionares pode alterar a ontogênese normal do telencéfalo, podendo levar ao surgimento de células em camadas inapropriadas e/ou ao surgimento de ectopias.

Demonstramos ainda que a morte celular nas zonas proliferativas das eminências ganglionares durante o processo normal de desenvolvimento é baixa. A exposição pré-natal ao etanol pode aumentar a morte celular em duas regiões: na EGL e na EGC, porém o pequeno aumento não parece influenciar a população final desta região.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a exposição pré-natal ao etanol por um curto período de tempo é capaz de alterar a neurogênese normal em camundongos.

7 REFERÊNCIAS

ABEL, E. L. **Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects**. Plenum, New York, 1984.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. ARTMED 4^a edição, 2004.

AL-GHOUL, W. M.; MILLER, M. W. **Development of the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve of the rat and evidence for a transient synaptic field in the trigeminal sensory tract**. J Comp Neurol. 330 (4): 476-490, 1993b.

AL-GHOUL, W. M.; MILLER, M. W. **Orderly migration of neurons to the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve of the rat**. J Comp Neurol. 330 (4): 464-475. 1993a.

ALLANSSON, L.; KHATIBI, S.; OLSSON, T.; HANSSON, E. **Acute ethanol exposure induces [Ca²⁺]_i transients, cell swelling and transformation of actin cytoskeleton in astroglial primary cultures**. J Neurochem. 76 (2): 472-479, 2001.

AL-RABIAI, S.; MILLER, M. W. **Effect of pré-natal exposure to ethanol on the ultrastructure of layer V of mature rat somatosensory cortex**. J Neurocytol. 18 (6): 711-729, 1989.

ALTMAN, J. **Are new neurons formed in the brain of adult mammals?** Science 135: 1127-1128, 1962.

ALTMAN, J.; BAYER, S. A. **Pré-natal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum**. J Comp Neurol. 179 (1): 23-48, 1978.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. **Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions**. J Comp Neurol. 126 (3): 337-389, 1966.

ANDERSON, S. A.; EISENSTAT, D. D.; SHI, L.; RUBENSTEIN, J. L. **Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes.** Science. 278 (5337): 474-6, 1997a

ANDERSON, S. A.; MARIN, O.; HORN, C.; JENNINGS, K.; RUBENSTEIN, J. L. **Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences.** Development 128: 353-363, 2001.

ANG, E. S. JR; HAYDAR, T. F.; GLUNCIC, V.; RAKIC, P. **Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex.** J Neurosci. 23 (13): 5805-15, 2003.

ANGEVINE, J. B. JR. **Time and origin in the hippocampal region: an autoradiographic study in the mouse.** Exp Neurol Suppl 2: 1-70, 1965.

ANGEVINE, J. B. JR; SIDMAN, R. L. **Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse.** Nature 25; 192: 766-8, 1961.

ARCHIBALD, S. L.; FRENEMA-NOTESTINE, C.; GAMST, A.; RILEY, E. P.; MATTSON, S. N.; JERNIGAN, T. L. **Brain dysmorphology in individuals with severe pré-natal alcohol exposure.** Dev Med Child Neurol 43: 148-154, 2001.

ASHWELL, K. W.; WAITE, P. M. **Cell death in the developing trigeminal nuclear complex of the rat.** Brain Res Dev Brain Res. 63 (1-2): 291-295, 1991.

AUTTI-RAMO, I.; AUTTI, T.; KORKMAN, M.; KETTUNEN, S.; SALONEN, O.; VALANNE, L. **MRI finding in children with school problems who had been exposed pré-natally to alcohol.** Dev Med Child Neurol 44: 98-106, 2002.

AUTTI-RÄMÖ, L; GAILY, E.; GRANSTRÖM, M. L. **Dysmorphic features in offspring of alcoholic mothers.** Arch. Dis. Child. 67(6): 712-716, 1992.

AUTTI-RÄMÖ, L; GRANSTRÖM, M. L. **The effect of intrauterine alcohol exposition in various duration on early cognitive development.** Neuropediatr 22(4): 203-210, 1991.

BAILEY, C. D. C.; BRIEN, J. F.; REYNOLDS, J. N. **Chronic pré-natal ethanol exposure alters the propotion of GABAergic neurons in layers II/III of the adult guinea pig somatosensory cortex.** Neurotoxicology and Teratology.; 26 (1); 59-63 2004.

BAUER-MOFFET, C.; ALTMAN, J. **The effects of ethanol chronically administered to preweaning rats on cerebelar development: a morphological study.** Brain Res 119: 249-268, 1977.

BAYE, S. A.; ALTMAN, J. **Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon.** Prog Neurobiol 29: 57-106, 1987.

BAYER, S. A. **Development of the hippocampal region of the rat. I. neurogenesis examined with ³H-thymidine autoradiography.** J Comp Neurol 190: 87-114, 1980.

BAYER, S. A.; ALTMAN, J. **Neocortical Development.** Raven Press, New York, 1991.

BEAULIEU, C. **Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population.** Brain Res. 23; 609 (1-2): 284-92, 1993.

BERRY, M.; ROGERS, A. W. **The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex.** J Anat 99: 691-709, 1965.

BERRY, M.; ROGERS, A. W.; EAYRES, J. T. **Pattern of cell migration during cortical histogenesis.** Nature 203: 591-593, 1964.

BHATARA, V. S.; LOVREIN, F.; KIRKEBY, J.; SWAYZE, V.; UNRUH, E.; JOHNSON, V. **Brain functions in fetal alcohol syndrome assessed by single-photon emission computed tomography.** South Dakota J Med 55: 59-62, 2002.

BHIDE, P. G. **Cell Cycle Kinetics in the Embryonic Mouse Corpus Striatum** J. Comp. Neurol. 374: 506-522, 1996.

BLACKSHEAR, P. J.; SILVER, J.; NAIRN, A. C.; SULIK, K. K.; SQUIER, M. V.; STUMPO, D. J.; TUTTLE, J. S. **Widespread neuronal ectopia associated with secondary defects in cerebrocortical chondroitin sulfate proteoglycans and basal lamina in MARCKS-deficient mice.** Exp Neurol. 145 (1): 46-61, 1997.

BLASCHKE, A. J.; STALEY, K; CHUN, J. **Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex.** Development. 122 (4): 1165-1174, 1996.

BLASCHKE, A. J.; WEINER, J. A.; CHUN, J. **Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system.** J Comp Neurol. 396 (1): 39-50, 1998.

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

BOULDER COMMITTEE. **Embryonic vertebrate nervous system: revised terminology.** Anat Rec 166: 257-262, 1970.

BURD, L.; COTSONAS-HASSLER, T. M.; MARTSOLF, J. T.; KERBESHIAN, J. **Recognition and management of fetal alcohol syndrome.** Neurotoxicol Teratol 25 (6): 681-8, 2003.

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

CAVINESS, V. S. JR; GOTO, T.; TARUI, T.; TAKAHASHI, T.; BHIDE, P. G.; NOWAKOWSKI, R. S. **Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process.** Cereb Cortex. 13 (6): 592-8, 2003.

CAVINESS, V. S. JR; TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S. **Neuronogenesis and the early events of neocortical histogenesis.** Results Probl Cell Differ 30: 107-43, 2000.

CAVINESS, V. S. JR; TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S. **Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model.** Trends Neurosci. 18 (9): 379-83, 1995.

CHARNESS, M. E.; SAFRAN, R. M.; PERIDES, G. **Ethanol inhibits neural cell-cell adhesion.** J Biol Chem 269 (12): 9304-9309, 1994.

CHENN, A.; WALSH, C. A. **Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice.** *Cereb Cortex.* 13 (6): 599-606, 2003.

CHENN, A.; WALSH, C. A. **Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors.** *Science.* 297 (5580): 365-9, 2002.

CHEVASSUS-AU-LOUIS, N.; REPRESA, A. **The right neuron at the wrong place: biology of heterotopic neurons in cortical neuronal migration disorders, with special reference to associated pathologies.** *Cell Mol Life Sci* 55 (10): 1206-1215, 1999.

CLARCK, C. M.; LI, D.; CONRY, J.; CONRY, R.; LOOCK, C. **Structural and functional brain integrity of fetal alcohol syndrome in nonretarded cases.** *Pediatrics* 105: 1096-1099, 2000.

CLARREN, S.K.; SMITH, D.W. **The fetal alcohol syndrome.** *N Engl J Med* 298: 1063-1067, 1978.

CLIMENT, E.; PASCUAL, M.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. **Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways.** *J Neurosci Res.* 68 (2): 213-225, 2002.

COBAS, A.; FAIRÉN, A. **GABAergic neurons of different morphological classes are cogenerated in the mouse barrel cortex.** *J Neurocytol.* 17 (4): 511-9. 1988.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R. **Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180.** *Cancer Res.* 17 (1): 15-20, 1957.

CORBIN, J. G.; GAIANO, N.; MACHOLD, R. P.; LANGTON, A.; FISHELL, G. **The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development.** *Development* 127: 5007-5020, 2000.

CORBIN, J. G.; NERY, S.; FISHELL, G. **Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain** *nature neurosc suppl* 4: 1177-1182, 2001.

COSTELL, M.; GUSTAFSSON, E.; ASZÓDI, A.; MÖRGELIN, M.; BLOCH, W.; HUNZIKER, E.; ADDICKS, K.; TIMPL, R.; FÄSSLER, R. **Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes.** J Cell Biol 147 (5): 1109-1122, 1999.

CREWS, F. T.; MDZINARISHVILI, A.; KIM, D.; HE, J.; NIXON, K. **Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol** Neuroscience 137: 437-445, 2006.

CREWS, F. T.; MDZINARISHVILI, A.; KIM, D.; HE, J.; NIXON, K. **Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol** Neuroscience 137: 437-445, 2006.

DAVIS, P. J. M.; PARTRIDGE, J. W.; STORRS, C. N. **Alcohol consumption in pregnancy. How much is safe?** Arch Dis Child 57: 940-943, 1982.

DENAXA, M.; CHAN, C. H.; SCHACHNER, M.; PARVANELAS, J. G.; KARAGOGEOS, D. **The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system.** Development 128 (22): 4635-4644, 2001.

DIAZ, J.; SAMSON, H. H. **Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol.** Science. 208 (4445): 751-753, 1980.

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. 155 (1): 1-13, 2005.

DULABON, L.; OLSON, E. C.; TAGLIENTI, M. G.; EISENHUTH, S.; MCGRATH, B.; WALSH, C. A.; KREIDBERG, J. A.; ANTON, E. S. **Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration.** Neuron 27 (1): 33-44, 2000.

EDMONDSON, J. C.; HATTEN, M. E. **Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study.** J. Neurosci. 7, 1928–1934, 1987.

FAIRÉN, A.; COBAS, A.; FONSECA, M. **Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex.** J Comp Neurol. 251 (1): 67-83, 1986.

FENTRESS, J. C.; STANFIELD, B. B.; COWAN, W. M. **Observation on the development of the striatum in mice and rats.** Anat Embryol (Berl) 163 (3): 275-98, 1981.

FERNÁNDEZ, V.; BRAVO, H.; KULJIS, R.; FUENTES, I. **Autoradiographic study of the development of the neostriatum in the rabbit.** Brain Behav Evol 16 (2): 113-28, 1979.

FUJITA, S. **Mitotic pattern and histogenesis of the central nervous system.** Nature 185: 702-703, 1960.

FUJITA, S.; MIYAKE, S. **Selective labeling of cell groups and its application to cell groups and its application to cell identification.** Exp Cell Res. 28: 158-61, 1962.

GALEA, P.; GOEL, K. **The fetal alcohol syndrome.** Scott. Med. J. 34 (4): 505, 1989.

GERFEN, C. R.; WILSON, C. J. **The basal ganglia.** In: SWANZON, L.; BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. (eds). **Handbook of chemical Neuroanatomy**, Vol 12, Integrated Systems in the CNS, Part III. Elsevier. Amsterdam, pp 371-468, 1996.

GOODLETT, C. R.; HORN, K. H. **Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system.** Alcohol Res Health 25 (3): 175-184, 2001.

GOODLETT, C. R.; LUNDAHL, K. R. **Temporal determinants of neonatal alcohol-induced cerebellar damage and motor performance deficits.** Pharmacol Biochem Behav 55: 531-540, 1996.

GOODLETT, C. R.; MARCUSSEN, B. L.; WEST, J. R. **A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss.** Alcohol 7: 107-114, 1990.

GOODLETT, C. R.; MARCUSSEN, B. L.; WEST, J. R. **A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss.** Alcohol. 7 (2): 107-114, 1990.

GREGHI, R. M.; BRUNO, M. C.; NASCIMENTO, E. T.; MURAHOVSKI, J.; SILVA, F. R. S. V. **Síndrome alcohólica fetal.** Rev. Paul. Pediatr. 8(31): 154-155, 1990.

GUASCH, R. M.; TOMAS, M.; MIÑAMBRES, R.; VALLES, S.; RENAUPQUERAS, J.; GUERRI, C.. **RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol.** J Neurosci Res 72(4): 487-502, 2003.

HACK, I.; BANCILA, M.; LOULIER, K.; CARROLL, P.; CREMER, H. **Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis** Nat Neurosci. 5 (10): 939-945, 2002.

HALFTER, W.; DONG, S.; YIP, Y. P.; WILLEM, M.; MAYER, U. **A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis.** J Neurosci. 22 (14): 6029-6040, 2002.

HAMASAKI, T.; GOTO, S.; NISHIKAWA, S.; USHIO, Y. **Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum.** Brain Research Reviews 41: 1–12, 2003.

HAMBURGER, V.; LEVI-MONTALCINI, R. **Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions.** J Exp Zool. 111 (3): 457-501, 1949.

HANSON, J. W.; JONES, K. L.; SMITH, D. W. **Fetal alcohol syndrome. Experience with 41 patients.** JAMA 235: 1458-1460, 1976.

HANSON, J. W.; STREISSGUTH, A. P.; SMITH, D. W. **The effects of moderate alcohol consumption during pregnancy on fetal growth and morphogenesis.** J. Pediatr. 92(3): 457-460, 1978.

HASSLER, J. A.; MORAN, D. J. **Effects of ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: possible role in teratogenesis.** J Craniofac Genet Dev Biol Suppl 2: 129-136, 1986b.

HASSLER, J. A.; MORAN, D. J. **The effects of ethanol on embryonic actin: a possible role in teratogenesis.** Experientia 42 (5): 575-7, 1986a.

HAYES, N. L.; NOWAKOWSKI, R. S. **Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase.** Dev Neurosci. 22 (1-2): 44-55, 2000.

HEATON, M. B.; MITCHELL, J. J.; PAIVA, M.; WALKER, D.; W. **Ethanol-induced alterations in the expression of neurotrophic factors in the developing rat central nervous system.** Brain Res Dev Brain Res 121 (1):97-107, 2000.

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

HEWITT, W. **The development of the human caudate and amygdaloid nuclei.** J Anat. 92 (3): 377-82, 1958.

HIRAI, K.; YOSHIOKA, H.; KIHARA, M.; HASEGAWA, K.; SAWADA, T.; FUSHIKI, S. **Effects of ethanol on neuronal migration and neural cell adhesion molecules in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study.** Brain Res Dev Brain Res. 118 (1-2): 205-210, 1999b.

HOYSETH, K. S.; JONES, P. J. H. **Ethanol induced teratogenesis: characterization, mechanisms and diagnostic approaches.** Life Sci 44 (10): 643-649, 1989.

JACOBSON, M. **Developmental Neurobiology.** Plenum, New York, 1991.

JERED, J. S.; SERUR, D.; WISNIEWSKI, K.; FISCH, C.; **Frequency of agenesis of the corpus callosum in the developmentally disabled population as determined by computerized tomography.** Pediatr Neurosci 12: 101-103, 1986.

JOHNSON, V. P.; SWAYZE, V. W.; SATO, Y.; ANDREASEN, N. C. **Fetal alcohol syndrome: craniofacial and central nervous system manifestations.** Am J Med Genet 61: 329-339, 1996.

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

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

KAUSHAL, D.; CONTOS, J. J.; TREUNER, K.; YANG, A. H.; KINGSBURY, M. A.; REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; OKABE, M.; BARLOW, C.; CHUN, J. **Alteration of gene expression by chromosome loss in the postnatal mouse brain.** *J Neurosci.* 23 (13): 5599-5606, 2003.

KENNEDY, L. A.; ELLIOT, M. J. **Cell proliferation in the embryonic mouse neocortex following acute maternal alcohol intoxication.** *Int J Dev Neurosci* 3: 311-315, 1985.

KOMATSU, S.; SAKATA-HAGA, H.; SAWADA, K.; HISANO, S.; FUKUI, Y. **Pré-natal exposure to ethanol induces leptomenigeal heterotopia in the cerebral cortex of the rat fetus.** *Acta Neuropathol* 101: 22-26, 2001.

KORNGUTH, S. E.; RUTLEDGE, J. J.; SUNDERLAND, E.; SIEGEL, F.; CARLSON, I.; SMOLLENS, J.; JUHL, U.; YOUNG, B. **Impeded cerebellar development and reduced serum thyroxine levels associated with fetal alcohol intoxications.** *Brain Res* 177: 347-360, 1979.

KOTKOSKIE, L. A.; NORTON, S. **Pré-natal brain malformations following acute ethanol exposure in the rat.** *Alcohol Clin Exp Res* 12: 831-836, 1988.

KUHN, P. E.; MILLER, M. W. **c-neu oncoprotein in developing rostral cerebral cortex: relationship to epidermal growth factor receptor.** *J Comp Neurol.* 372 (2): 189-203, 1996.

KUHN, P. E.; MILLER, M. W. **Expression of p53 and ALZ-50 immunoreactivity in rat cortex: effect of pré-natal exposure to ethanol.** *Exp Neurol.* 154(2):418-429, 1998.

LAMMERS, G. J.; GRIBNAU, A. A.; TEN DONKELAAR, H. J. **Neurogenesis in the basal forebrain in the Chinese hamster (*cricetulus griseus*). II. Site of neuron origin: morphogenesis of the ventricular ridges.** *Anat Embryol (Berl)* 158(2): 193-211, 1980.

LARROQUE, B. **Alcohol and the fetus.** *J. Epidemiol.* 21(4) suppl 1: 58-96, 1992.

LAVDAS, A. A.; GRIGORIOU, M.; PACHNIS, V.; PARNAVELAS, J. G. **The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex.** *J Neurosci.* 19 (18): 7881-7818, 1999.

LEMOINE, P.; HAROUSSEAU, H.; BORTEYRU, J. P.; MENUET, J. C. **Les enfants de parents alcooliques: anomalies observées à propos de 127 cas.** Oest Med 21: 476-482, 1968.

LEONARD, B. J.; BOETTCHER, L. M.; BRUST, J. D. **Alcohol-related birth defects. Minnesota's response to a critical health problem.** Brist J D Minn Med 74 (12): 23-25, 1991.

LETINIC, K.; ZONCU, R.; RAKIC, P. **Origin of GABAergic neurons in the human neocortex.** Nature 417 (6889): 645-9, 2002.

LI, Z.; LIN, H.; ZHU, Y.; WANG, M.; LUO, J. **Disruption of cell cycle kinetics and cyclin-dependent kinase system by ethanol in cultured cerebellar granule progenitors.** Brain Res Dev Brain Res. 132 (1): 47-58, 2001.

LI, Z.; MILLER, M. W.; LUO, J. **Effects of pré-natal exposure to ethanol on the cyclin-dependent kinase system in the developing rat cerebellum.** Brain Res Dev Brain Res. 139 (2): 237-45, 2002.

LIGHT, K. E.; BELCHER, S. M.; PIERCE, D. R. **Time course and manner of Purkinje neuron death following a single ethanol exposure on postnatal day 4 in the developing rat.** Neuroscience 114 (2): 327-337, 2002.

LIGHT, K. E.; GE, Y.; BELCHER, S. M. **Early postnatal ethanol exposure selectively decreases BDNF and truncated TrkB-T2 receptor mRNA expression in the rat cerebellum.** Mol Brain Res 93: 46-55, 2001.

LITTLE, B. B.; SNELL, L. M.; ROSENFELD, C. K.; GILSTRAP, L. C.; GANT, N. F. **Failure to recognize fetal alcohol syndrome in newborn infants.** Am J Dis Child 144 (10): 1142-1146, 1990.

LOSSI, L.; MERIGHI, A. **In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS.** Prog Neurobiol. 69 (5): 287-312, 2003.

LUO, J.; MILLER, M. W. **Transforming growth factor beta1-regulated cell proliferation and expression of neural cell adhesion molecule in B104 neuroblastoma cells: differential effects of ethanol.** J Neurochem 72 (6): 2286-2293, 1999.

MAIER, S. E.; CRAMER, J. A.; WEST, J. R.; SOHRABJI, F. **Alcohol exposure during the first two trimesters equivalent alters granule cell number and neurotrophin expression in the developing rat olfactory bulb.** J Neurobiol. 41 (3):414-423, 1999.

MARCHAND, R.; LAJOIE, L. **Histogenesis of the striopallidal system in the rat. Neurogenesis of its neurons.** Neuroscience. 17 (3): 573-590, 1986.

MARIN, O.; ANDERSON, S. A.; RUBENSTEIN, J. L. **Origin and molecular specification of striatal interneurons.** J Neurosci. 20 (16): 6063-6076, 2000.

MARIN, O.; RUBENSTEIN, J. L. **A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon.** Nat Rev Neurosci 2: 780-790, 2001.

MARIN, O.; RUBENSTEIN, J. L. **Cell migration in the forebrain.** Annu Rev Neurosci 26: 441-483, 2003.

MARÍN-PADILLA, M. **Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex.** Trends Neurosci. 21 (2): 64-71, 1998

MARÍN-PADILLA, M. **Early pré-natal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization.** Z. Anat. Entwicklungsgesch. 134, 117–145, 1971.

MARIN-PADILLA, M. **Structural organization of the human cerebral cortex prior to the appearance of the cortical plate.** Anat Embryol 168: 21-40, 1983.

MARTIN, L. J. **Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury.** Int J Mol Med 7(5): 455-478, 2001.

MATTSON, S. N.; RILEY, E. P.; SOWELL, E. R.; JERNIGAN, T. L.; SOBEL, D. F.; JONES, K. L. **A decrease in the size of the basal ganglia in children with fetal alcohol syndrome.** Alcohol Clin Exp Res 20: 1088-1093, 1996.

MIALE, I. L.; SIDMAN, R. L. **An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum.** Exp Neurol. 4: 277-296, 1961.

MILLER MW. **Maturation of rat visual cortex: IV. The generation, migration, morphogenesis, and connectivity of atypically oriented pyramidal neurons.** J Comp Neurol. 274(3): 387-405, 1988b.

MILLER, M. W. **A longitudinal study of the effects of pré-natal ethanol exposure on neuronal acquisition and death in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: interactions with changes induced by transection of the infraorbital nerve.** J Neurocytology 28: 999-1015, 1999.

MILLER, M. W. **Brain development: normal processes and the effects of alcohol and nicotine.** Oxford University Press, 2006.

MILLER, M. W. **Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex.** Brain Res 355: 187-192, 1985.

MILLER, M. W. **Effect of pre- or postnatal exposure to ethanol on the total number of neuron in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: cell proliferation and neuronal death.** Alcohol Clin Exp Res 19: 1359-1363, 1995b.

MILLER, M. W. **Effect of pré-natal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: I. Neuronal generation.** Alcohol Clin Exp Res. 12(3): 440-449. 1988a.

MILLER, M. W. **Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons.** Science 233: 1308-1311, 1986.

MILLER, M. W. **Effects of early exposure to ethanol on the protein and DNA contents of specific brain regions.** Brain Res 734: 286-294, 1996b.

MILLER, M. W. **Effects of pré-natal exposure to ethanol on neocortical development: II. Cell proliferation in the ventricular and subventricular zones of the rat.** J Comp Neurol 287: 326-338, 1989.

MILLER, M. W. **Expression of transforming growth factor-beta in developing rat cerebral cortex: effects of pré-natal exposure to ethanol.** J Comp Neurol 460 (3): 410-424, 2003.

MILLER, M. W. **Generation of neuron in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of pré-natal and postnatal treatment with ethanol.** Alcohol Clin Exp Res 19: 1500-1509, 1995a.

MILLER, M. W. **Kinetics of the migration of neurons to rat somatosensory cortex.** Brain Res Dev Brain Res. 115(2): 111-122, 1999.

MILLER, M. W. **Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex.** Alcohol Clin Exp Res 20: 139-143, 1996a.

MILLER, M. W. **Mechanisms of ethanol induced neuronal death during development: from the molecule to behavior.** Alcohol Clin Exp Res 20 (8 Suppl): 128A-132A, 1996c.

MILLER, M. W. **Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol.** Alcohol Clin Exp Res. 17(2): 304-314, 1993.

MILLER, M. W. **Relationship of time of origins and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons.** J Comp Neurol 355: 6-14, 1995c.

MILLER, M. W.; AL-GHOUL, W. M. **Numbers of neurons in the developing principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: enhanced survival of early-generated neurons over late-generated neurons.** J Comp Neurol 330 (4): 491-501, 1993.

MILLER, M. W.; DOW-EDWARDS, D. L. **Structural and metabolic alterations in rat cerebral cortex induced by pré-natal exposure to ethanol.** Brain Res 474 (2): 316-326, 1988.

MILLER, M. W.; DOW-EDWARDS, D. L. **Vibrissal stimulation affects glucose utilization in the trigeminal/somatosensory system of normal rats and rats pré-natally exposed to ethanol.** J Comp Neurol 335 (2): 283-284, 1993.

MILLER, M. W.; KUHN, P. E. **Cell cycle kinetics in fetal rat cerebral cortex: effects of pré-natal treatment with ethanol assessed by a cumulative labeling technique with flow cytometry.** Alcohol Clin Exp Res. 19 (1): 233-237, 1995.

MILLER, M. W.; LUO, J. **Effects of ethanol and transforming growth factor β (TGF β) on neuronal proliferation and nCAM expression.** Alcohol Clin Exp Res 26: 1281-1285, 2002a.

MILLER, M. W.; MULLER, S. J. **Structure and histogenesis of the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: effects of pré-natal exposure to ethanol.** J Comp Neurol 282: 570-580, 1989.

MILLER, M. W.; NOWAKOWSKI, R. S. **Effects of pré-natal exposure to ethanol on the cell cycle kinetics and growth fractions in the proliferative zones of fetal rat cerebral cortex.** Alcohol Clin Exp Res 15: 229-232, 1991.

MILLER, M. W.; NOWAKOWSKI, R. S. **Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system.** Brain Res. 457 (1): 44-52, 1988.

MILLER, M. W.; POTEMPA, G. **Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: effects of pré-natal exposure to ethanol.** J Comp Neurol 293 (1): 92-102, 1990.

MILLER, M. W.; ROBERTSON, S. **Pré-natal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex.** J Comp Neurol 337 (2):253-266, 1993.

MISSON, J. P.; AUSTIN, C. P.; TAKAHASHI, T.; CEPKO, C. L.; CAVINESS, V. S. JR. **The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system.** Cereb. Cortex 1, 221-229, 1991.

MOONER, S. M.; SIEGENTHALER, J. A.; MILLER, M. W. **Ethanol induces heterotopias in organotypic cultures of rat cerebral cortex.** Cereb Cortex 14: 1071-1080, 2004.

MOONEY, S. M.; MILLER, M. W. **Effects of pré-natal exposure to ethanol on the expression of bcl-2, bax and caspase 3 in the developing rat cerebral cortex and thalamus.** Brain Res 17 911 (1): 71-81, 2001.

MOONEY, S. M.; MILLER, M. W. **Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat.** Brain Res Dev Brain Res 123 (2):103-17, 2000.

MOONEY, S. M.; NAPPER, R. M. **Early postnatal exposure to alcohol reduces the number of neurons in the occipital but not the parietal cortex of the rat.** *Alcohol Clin Exp Res.* 29 (4): 683-691, 2005.

MOONEY, S. M.; NAPPER, R. M.; WEST, J. R. **Long-term effect of postnatal alcohol exposure on the number of cells in the neocortex of the rat: a stereological study.** *Alcohol Clin Exp Res.* 20 (4): 615-623, 1996.

MOREST, D. K. **A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young.** *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 130, 265–305, 1970.

NADARAJAH, B.; BRUNSTROM, J. E.; GRUTZENDLER, J.; WONG, R. O.; PEARLMAN, A. L. **Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex.** *Nat Neurosci* 4: 143–150, 2001.

NERY, S.; FISHELL, G.; CORBIN, J. G. **The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations.** *Nat Neurosci.* 5(12): 1279-1287, 2002.

NORNES, H. O.; MORITA, M. **Time of origin of the neurons in the caudal brain stem of rat. An autoradiographic study.** *Dev Neurosci* 2: 101-114, 1979.

O'ROURKE, N. A.; DAILEY, M. E.; SMITH, S. J.; MCCONNELL, S. K. **Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex.** *Science* 258: 299–302, 1992.

O'ROURKE, N. A.; SULLIVAN, D. P.; KAZNOWSKI, C. E.; JACOBS, A. A.; MCCONNELL, S. K. **Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex.** *Development* 121: 2165–2176, 1995.

O'NEILL, G. T.; KAUFMAN, M. H. **Cytogenetic analysis of first cleavage fertilized mouse eggs following in vivo exposure to ethanol shortly before and at the time of conception.** *Development* 100, 441-44S, 1987.

OPPENHEIM, R. W. **Cell death during development of the nervous system.** *Annu Rev Neurosci.* 14: 453-501, 1991.

PEARLMAN, A. L.; SHEPPARD, A. M. **Extracellular matrix in early cortical development.** *Prog Brain Res* 108: 117-134, 1996.

PETERS, A.; KARA, D. A.; HARRIMAN, K. M. **The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. III. Numerical considerations.** J Comp Neurol. 238(3): 263-74, 1985.

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

PLOCK, T. L.; MIRANDA, R. C. **Embryonic cerebral cortical progenitors are resistant to apoptosis, but increase expression of suicide receptor DISC-complex genes and suppress autophagy following ethanol exposure.** Alcohol Clin Exp Res 31(4): 694-703, 2007.

POWELL, E. M.; MARS, W. M.; LEVITT, P. **Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon.** Neuron. 30(1): 79-89, 2001.

QUESADA, A.; PRADA, F. A.; ESPINAR, A.; GENIS-GALVEZ, J. M. **Effect of ethanol on the cerebellar cortex of the chick embryo.** Histol Histopathol 5: 315-324, 1990a.

QUESADA, A.; PRADA, F. A.; ESPINAR, A.; GENIS-GALVEZ, J. M. **Effect of ethanol on the morphohistogenesis and differentiation of cerebellar granule cells in the chick embryo.** Alcohol 7: 419-428, 1990b.

RAKIC, P. **Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex.** Brain Res. 33, 471-476, 1971.

RAKIC, P. **Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex.** J. Comp. Neurol 145 (1): 61-83, 1972.

RAKIC, P. **Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition.** Science 183, 425-427, 1974.

RAKIC, P.; STENSAS, L. J.; SAYRE, E.; SIDMAN, R. L. **Computer-aided three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial electron microscopic montages of foetal monkey brain.** Nature 250: 31-34, 1974.

RAMANATHAN, R.; WILKEMEYER, M. F.; MITTAL, B.; PERIDES, G.; CHARNESSE, M. E. **Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1.** J Cell Biol 133 (2): 381-390, 1996. Errata em J Cell Biol 133 (5): 1139-40, 1996.

REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; KAUSHAL, D.; KINGSBURY, M. A.; YANG, A. H.; CHUN, J. **Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system.** Proc Natl Acad Sci U S A 98 (23): 13361-13366, 2001.

REN, J. Q.; AIKA, Y.; HEIZMANN, C. W.; KOSAKA, T. **Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons.** Exp Brain Res.92 (1): 1-14, 1992.

RIIKONEN, R.; SALOMEN, I.; PARTANEN, K.; VEHRO, S. **Brain perfusion SPECT and MRI in foetal alcohol syndrome.** Dev Med Child Neurol 41: 652-659, 1999.

RILEY, E. P.; MATTSON, S. N.; SOWELL, E. R.; JERNIGAN, T. L.; SOBEL, D. F.; JONES, K. L. **Abnormalities of the corpus callosum in children pré-natally exposed to alcohol.** Alcohol Clin Exp Res 19: 1198-1202, 1995.

ROSSET, H.L.; WEINER, L; EDELIN, K.C. **Strategies for prevention of fetal alcohol effects.** Obstetr. Gynecol. 57: 1-7, 1981.

RUBERT, G.; MIÑANA, R.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. **Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes** J Neurosci Res 84 (3): 483-96, 2006.

SAMPSON, P. D.; STREISSGUTH, A. P.; BOOKSTEIN, F. L.; BARR, H. M. **On categorization in analyses of alcohol teratogenesis.** Environ Health Perspect 108 (Suppl 3): 421 – 428, 2000.

SANTILLANO, D. R.; KUMAR, L. S.; PLOCK, T. L.; CAMARILLO, C.; TINGLING, J. D.; MIRANDA, R. C. **Ethanol induces cell-cycle activity and reduces stem cell diversity to alter both regenerative capacity and differentiation potential of cerebral cortical neuroepithelial precursors.** BMC Neuroscience 6: 59, 2005.

SARI, Y.; POWROZEK, T.; ZHOU, F. C. **Alcohol deters the outgrowth of serotonergic neurons at midgestation.** J Biomed Sci 8: 119-125, 2001.

SAUER, F. C. **The interkinetic migration of embryonic epithelial nuclei.** J Morphol 60: 1-11, 1936.

SAYHYAN, P.; GOLDEN, H. B.; MIRANDA, R. C. **Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an *ex vivo* model of the fetal cerebral cortical.** *Neuroepithelium J. Neurosci.* 27(32): 8546–8557, 2007.

SCHLESSINGER, A. R.; COWAN, W. M.; SWANSON, L. W. **The time of origin of neuron in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields.** *Anat Embriol* 154: 153-173, 1978.

SHETH, A. N.; BHIDE, P. G. **Concurrent cellular output from two proliferative populations in the early embryonic mouse corpus striatum.** *J Comp Neurol.*383 (2): 220-230, 1997.

SIDMAN, R. L. **Autoradiographic methods and principles for study of the nervous system with thymidine-H³.** In: Nauta, W. J. H.; Ebbesson, S. O. E. (ed). **Contemporary research Methods in Neuroanatomy.** Springer, New York, pp 252-274, 1970.

SIDMAN, R. L.; MIALE, I. L.; FEDER, N. **Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiography study of histogenesis in the nervous system.** *Exp Neurol* 1: 322-333, 1959.

SIEGENTHALER, J. A.; MILLER M. W. **Ethanol disrupts cell cycle regulation in developing rat cortex: interaction with transforming growth factor β 1.** *J Neurochem* 95(3): 902-912, 2005a.

SIEGENTHALER, J. A.; MILLER M. W. **Transforming growth factor β 1 modulates cell migration in rat cortex: effects of ethanol.** *Cereb Cortex* 14: 791-802, 2004.

SIEGENTHALER, J. A.; MILLER, M. W. **Transforming growth factor beta 1 promotes cell cycle exit through the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the developing cerebral cortex.** *J Neurosci* 25(38): 8627-8636, 2005b.

SMART IH, MCSHERRY GM. **Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production.** *J Anat.* 134(Pt 3): 415-442, 1982.

SMART IH. **A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain.** *J Anat.* 121(Pt 1):71-84, 1976.

SMART, I. H. M. **A pilot study of the cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain.** J Anat 121: 71-84, 1976.

SMART, I. H. **The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as show by radioautography after thymidine-H³ injection.** J Comp Neurol 116: 325-347, 1961.

SMARTH, I. H. M.; STURROCK, R. R. **Ontogeny of the neostriatum.** In: Divac, I.; Oberg, R. (eds). **The Neostriatum.** Plenum Press. Oxford, pp 127-146.

SOKOL, R. J.; DELANEY-BLACK, V.; NORDSTROM, B. **Fetal Alcohol Spectrum Disorder.** JAMA 290 (22): 2996-2999, 2003.

SOWELL, E. R.; JERNIGAN, T. L.; MATTSON, S. N.; RILEY, E. P.; SOBEL, D. F.; JONES, K. L. **Abnormal development of the cerebellar vermis in children pré-natally exposed to alcohol: size reduction in lobules I-V.** Alcohol Clin Exp Res 20: 31-34, 1996.

SOWELL, E. R.; MATTSON, S. N.; THOMPSON, P. M.; JERNIGAN, T. L.; RILEY, E. P.; TOGA, A. W. **Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy pré-natal alcohol exposure.** Neurology 57: 235-244, 2001a.

SOWELL, E. R.; THOMPSON, P. M.; MATTSON, S. N.; TESSNER, K. D.; JERNIGAN, T.; RILEY, E. P.; TOGA, A. W. **Voxel-based morphometric analyses of the brain in children and adolescents pré-natally exposed to alcohol.** Cognit Neurosci Neuropsychol 12: 515-523, 2001b.

SWAYZE, V. M.; JOHNSON, V. P.; HANSON, J. W.; PIVEN, J.; SATO, Y.; GIEDD, J. N.; MOSNIK, D.; ANDREASON, N. C. **Magnetic resonance imaging of brain anomalies in fetal alcohol syndrome.** Pediatrics 99: 232-240, 1997.

TAKAHASHI, T.; CAVINESS, V. S. JR; BHIDE, P. G. **Analysis of cell generation in the telencephalic neuroepithelium.** Methods Mol Biol 198: 101-113, 2002.

TAKAHASHI, T.; GOTO, T.; MIYAMA, S.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS, V. S. JR. **Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall.** J Neurosci. 19(23): 10357-10371, 1999.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI R. S.; CAVINESS JR, V. S. **Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse.** J. Neurosci 13: 820-833, 1993.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS, V. S. JR. **The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neuronogenesis.** J Neurosci. 16(19): 6183-6196, 1996.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS, V. S. JR. **The mathematics of neocortical neuronogenesis.** Dev Neurosci. 19(1): 17-22, 1997.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.S.; CAVINESS JR., V. S. **BuDR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone.** J. Neurocytol 21r 185-197, 1992.

TAMAMAKI, N.; FUJIMORI, K. E.; TAKAUJI, R. **Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone.** J Neurosci. 17(21): 8313-8323, 1997.

TANAKA, D.; NAKAYA, Y.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K.; MURAKAMI, F. **Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins.** Development.; 130 (23): 5803-5813, 2003.

TARUI, T.; TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; HAYES, N. L.; BHIDE, P. G.; CAVINESS, V. S. **Overexpression of p27 Kip 1, probability of cell cycle exit, and laminar destination of neocortical neurons.** Cereb Cortex. 15(9): 1343-1355 2005.

THOMAIDOU, D.; MIONE, M. C.; CAVANAGH, J. F.; PARNAVELAS, J. G. **Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex.** J Neurosci. 17 (3): 1075-1085, 1997.

TOMÁS, M.; LÁZARO-DIÉGUEZ, F.; DURÁN, J. M.; MARÍN, P.; RENAUPIQUERAS, J.; EGEA, G. **Protective effects of lysophosphatidic acid (LPA) on chronic ethanol-induced injuries to the cytoskeleton and on glucose uptake in rat astrocytes.** J Neurochem. 87 (1): 220-229, 2003.

ULLELAND, C. N. **The offspring of alcoholic mothers.** Ann NY Acad Sci 197: 167-169, 1972.

VALCANIS, H.; TAN, S. S. **Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex.** J Neurosci. 23 (12): 5113-5122, 2003.

VEMURI, M. C.; CHETTY, C. S. **Alcohol impairs astroglialogenesis by stem cells in rodent neurospheres.** Neurochemistry International 47: 129–135, 2005.

VINGAN, R. D.; DOW-EDWARDS, D. L.; RILEY, E. P. **Cerebral metabolic alterations in rats following pré-natal alcohol exposure: a deoxyglucose study.** Alcohol Clin Exp Res. 10 (1): 22-26, 1986.

VOYVODIC, J. T. **Cell death in cortical development: How much? Why? So what?** Neuron, Vol. 16, 693–696, 1996.

WEST, J. R.; GOODLETT, C. R.; BONTHIUS, D. J.; PIERCE, D. R. **Manipulating peak blood alcohol concentrations in neonatal rats: review of an animal model for alcohol-related developmental effects.** Neurotoxicology. 10 (3): 347-365, 1989.

WICHTERLE, H.; TURNBULL, D. H.; NERY, S.; FISHELL, G.; ALVAREZ-BUYLLA, A. **In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain.** Development 128: 3759-3771, 2001.

WILKEMEYER, M. F.; MENKARI, C. E.; CHARNESS, M. E. **Novel antagonists of alcohol inhibition of L1-mediated cell adhesion: multiple mechanisms of action.** Mol Pharmacol 62 (5): 1053-1060, 2002a.

WILKEMEYER, M. F.; MENKARI, C. E.; SPONG, C. Y.; CHARNESS, M. E. **Peptide antagonists of ethanol inhibition of L1-mediated cell-cell adhesion.** J Pharmacol Exp Ther 303 (1):110-116, 2002b.

WILKEMEYER, M. F.; PAJERSKI, M.; CHARNESS, M. E. **Alcohol inhibition of cell adhesion in BMP-treated NG108-15 cells.** Alcohol Clin Exp Res 23 (11): 1711-1720, 1999.

WILKEMEYER, M. F.; SEBASTIAN, A. B.; SMITH, S. A.; CHARNESS, M. E. **Antagonists of alcohol inhibition of cell adhesion.** Proc Natl Acad Sci U S A 97 (7): 3690-3695, 2000.

WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A. **Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death.** Cell. 74 (5): 777-779, 1993.

YOON, Y.; TÖRÖK, N.; KRUEGER, E.; OSWALD, B.; MCNIVEN, M. A. **Ethanol-induced alterations of the microtubule cytoskeleton in hepatocytes.** Am J Physiol. 274: G757-G766, 1998.

YUN, K.; POTTER, S.; RUBENSTEIN, J. L. **Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon.** Development 128: 193-205, 2001.

ZHOU, F. C.; SARI, Y.; ZHANG, J. K.; GOODLETT, C. R.; LI T. K. **Pré-natal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice.** Brain Res Dev Brain Res 126: 147-155, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)