

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

RICARDO NOBORO ISAYAMA

**EFEITOS DO ETANOL NA FORMAÇÃO DO SISTEMA
GABAÉRGICO TELENCEFÁLICO**

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

EFEITOS DO ETANOL NA FORMAÇÃO DO SISTEMA
GABAÉRGICO TELENCEFÁLICO

Ricardo Noboro Isayama

Tese submetida ao Programa de Ciências Morfológicas da UFRJ
visando a obtenção do título de Doutor em Ciências Morfológicas.

Orientadora: Daniela Uziel Rozental
Professora Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

Rio de Janeiro
2008

Isayama, Ricardo Noboro.

Efeitos do etanol na formação do sistema GABAérgico telencefálico / Ricardo Noboro Isayama.
Rio de Janeiro: UFRJ, PCM / ICB, 2008.

xvi, 113p.

Orientadora: Daniela Uziel Rozental

Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas/ Programa de Pós-graduação em
Ciências Morfológicas (2008)/ Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Referências bibliográficas: p. 74-97

1. Alcoolismo fetal. 2. Precusores GABAérgicos. 3. Camundongas alcoolizadas.
4. Síndrome alcoólica fetal

Tese de doutorado (Ciências Morfológicas / ICB)

Ricardo Noboro Isayama

EFEITOS DO ETANOL NA FORMAÇÃO DO SISTEMA
GABAÉRGICO TELENCEFÁLICO

Ricardo Noboro Isayama

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação
em Ciências Morfológicas do ICB da UFRJ visando a obtenção do
título de Doutor em Ciências Morfológicas

Aprovada em _____ de _____ de 2008

Profa. Daniela Uziel Rozental (Orientadora)
ICB-UFRJ

Prof. Stevens Kastrup Rehen
ICB-UFRJ

Prof. Marcelo Santiago
IBCCF-UFRJ

Profa. Patrícia Franca Gardino
IBCFF-UFRJ

Prof. Ricardo Reis
IBCFF-UFRJ

O presente trabalho foi realizado sob orientação da Professora Daniela Uziel Rozental nos Laboratórios de Ontogênese e Regeneração Neural e de Neuroplasticidade do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), na vigência dos auxílios e bolsas concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Flora Rodrigues Isayama e Haruo Isayama. À minha amada esposa Viviane Souto Gemignani Isayama.

"Agora pois guarda-te, não beba vinho ou bebida forte,... ...porque eis que tu conceberás e darás à luz um filho... ...consagrado a Deus,... ...desde o ventre materno até ao dia de sua morte." "

Bíblia-Juízes 13: 4-7

AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Filho e Espírito Santo, por tudo que tens feito por mim.

Aos amigos do Departamento de Anatomia da UFRJ, especialmente ao Laboratório de Neuroplasticidade e Laboratório de Ontogênese e Regeneração Neural.

Aos amigos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, especialmente, ao Laboratório de Neuroquímica e Neurobiologia da Retina.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UFRJ.

À minha família e amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia da Ilha do Governador.

Aos amigos do Instituto de Bioquímica da UFRJ.

Aos alunos de Graduação da UFRJ, pelo empenho na pesquisa biomédica, especialmente aos alunos de Biomedicina.

Aos bioterista Adiel e veterinário Paulo pela amizade e auxílio quanto aos cuidados dos animais de laboratório.

Aos meus mentores Renato e Daniela Rozental e Edna N. Yamasaki, pela amizade, auxílio e dedicação ao ensino e pesquisa biomédica. Meus agradecimentos por terem me acompanhado e apoiado nesta trajetória até a obtenção do título de Doutor.

Aos professores: Patrícia Franca Gardino, Paulo de Assis Melo, Ricardo Reis, Roberto Lent, Newton Castro, Jean Christophe Houzel, Stevens Kastrup Rehen, Vivaldo Moura Neto e tantos outros que me ajudaram no doutorado.

Aos amigos pesquisadores do Depto. de Anatomia e Biologia Celular da New York Medical College-NY, pela amizade e auxílio durante o período de estágio junto aos pesquisadores Patric K. Stanton e Renato Rozental.

Ao Paulo Emílio Correa Leite, pela amizade e auxílio nas técnicas de *western blot* para obtenção dos dados contidos neste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia da Neuroplasticidade e do Comportamento da UFRJ, especialmente à Amanda e Mônica Rocha pela amizade e pelo auxílio na análise dos testes de comportamento, incluídos neste trabalho.

Aos membros da banca de defesa de Tese de Doutorado, pela contribuição científica e amizade.

Aos amigos que participaram ativamente deste projeto, os alunos do laboratório de Neuroplasticidade, especialmente Jean Pierre Mendes Lima, Carolina Batista, Michele Lourenço, Marco Rocha, Rafael, Patrícia Pestana, Danilo Arruda Furtado e tantos outros que não cabe aqui citá-los sem correr o risco de esquecer-me de pessoas que foram extremamente importantes para a elaboração e execução desta Tese Doutoral.

À Lena Dalva Rubim e Ludmila Ribeiro, pelas orações e amizade.

Aos amigos de laboratórios vizinhos que, vez por outra, foram solicitados a contribuir com reagentes bem como com a experiência prática em ciências.

Aos funcionários que cuidam da manutenção da UFRJ e do bem estar do nosso ambiente de trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas pela dedicação em fazer deste programa uma referência na pesquisa brasileira em Neurociências.

Todos que, de alguma forma me auxiliaram para o êxito deste trabalho.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos do álcool na formação do sistema GABAérgico telencefálico, bem como sua relevância sobre os distúrbios relacionados à ingestão de álcool durante a gestação. Utilizamos fêmeas grávidas de camundongos *suíços*, que receberam etanol a 2g/Kg através por gavagem intragástrica entre os dias embrionários E11 e E14. O sangue das fêmeas foi coletado em tempos determinados para obtenção de curva de concentrações de álcool no plasma. Em E14, os encéfalos dos embriões dos grupos controle e alcoolizado foram utilizados para imunohistoquímica (GABA), *western blot* (GAD65/67) e marcação de TUNEL. Outros animais foram mantidos até estágios pós-natais para avaliação comportamental e técnica imunohistoquímica. Nossos resultados indicaram que as concentrações plasmáticas de álcool no sangue alcançaram um pico (127 ± 2.1 mg/dl) 45min após a gavagem e retornaram a zero em 3 horas. Mudanças macroscópicas não foram detectadas nos embriões e encéfalos embrionários do grupo alcoolizado. No entanto, houve aumento da expressão de GABA, principalmente na eminência ganglionar lateral (EGL) do grupo alcoolizado, sem alterações significativas na eminência ganglionar medial (EGM) e primórdio do córtex cerebral (CTX). Houve aumento significativo na expressão da GAD65/67 na EGL, sem alterações para a EGM e CTX. A quantificação da marcação por TUNEL revelou aumento significativo de morte neuronal na EGL e CTX. O modelo de alcoolismo utilizado não causou alteração da atividade locomotora espontânea nos animais pós-natais tratados. Concluímos que 2g/Kg de etanol administrado durante o período de migração tangencial não induz alterações drásticas no encéfalo embrionário, mas produz aumento da expressão de GABA e GAD em zonas proliferativas do telencéfalo ventral e morte celular aumentada em regiões específicas durante o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

In this study we investigated the effects of ethanol exposure on the development of the telencephalic GABAergic system. We administered ethanol (2g/Kg) using a gavage cannula to pregnant *swiss* mice between E11 and E14. We collected blood from the females to measure plasmatic concentrations of ethanol at specific time points after ethanol gavage. At E14, animals were sacrificed, embryos removed and dissected. Brains were used for immunohistochemistry (GABA), *western Blot* (GAD65/67), or labeling for TUNEL. Some litters were kept until postnatal ages for behavioral tests. Our results indicated that serum blood reached a peak (127 ± 2.1 mg/dl) at 45min after ethanol gavage and decreased to zero at 3h. Roughly we did not identify macroscopic modifications, such as exencephaly or anencephaly. Quantification of the immunohistochemistry for GABA showed an increase mainly at the lateral ganglionic eminence (LGE), but no significant alterations in the medial ganglionic eminence (MGE) or in the developing cortical plate. We also found a significant increase in the GAD65/67 expression at the LGE but not in the MGE or in the cortex. In contrast, TUNEL labeling revealed a significant increase in the rate of neuronal death in the LGE and in the cortex. In the behavioral tests no modification in animal's spontaneous locomotor activity was identified. We conclude that 2g/Kg ethanol during a short period at this specific developmental lag does not lead to significant alterations in the developing brain, but leads to mild increase in GABA and GAD expression in the proliferative zones of the basal telencephalon and to cell death in specific telencephalic regions.

SUMÁRIO

Agradecimentos	vii
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Ilustrações, Gráficos e Tabelas	xiv
Lista de abreviações	xv
1. Introdução	17
1.1. História, conceitos e problemática do álcool	17
1.2. Alcoolismo e síndrome alcoólica fetal (SAF).....	19
1.3. Desenvolvimento normal da população de células GABAérgicas corticais	24
1.4. Sistema GABAérgico e seu papel no desenvolvimento	28
1.5. Etanol e neurogênese	34
1.6. Etanol e morte celular	36
1.7. Etanol e desenvolvimento do sistema GABAérgico	40
1.8. Etanol e migração neuronal no desenvolvimento	42
1.9. Etanol e fatores tróficos / substrato de migração	44
1.10. Modelo proposto	46
2. Objetivos	48
3. Materiais e métodos	49
3.1. Animais e procedimentos.....	49
3.2. Tratamento.....	50
3.3. Dosagem plasmática de etanol.....	50
3.4. <i>Western Blot</i>	51
3.5. Imunohistoquímica	52
3.6. Detecção de morte celular (TUNEL)	54
3.7. Teste de comportamento (campo aberto).....	55
3.8. Análise estatística	56
4. Resultados	57
4.1. Protocolo etanol	57
4.2. Alcoolemia	57
4.3. Macroscopia.....	58

4.4. Avaliação da GAD 65 e 67 nas eminências e no córtex cerebral	60
4.5. Distribuição das células GABAérgicas nos encéfalos.....	61
4.6. Avaliação da morte celular no córtex cerebral e eminências ganglionares.	67
4.7. Teste comportamental (campo aberto)	68
5. Discussão	73
5.1. Modelos de exposição ao etanol.....	73
5.2. Etanol e comportamento	74
5.3. Formação do sistema GABAérgico sob exposição ao etanol	76
6. Conclusões	89
7. Referências Bibliográficas	90

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS E TABELAS

Figura	Página
1 Aspectos craniofaciais observados na Síndrome Alcólica Fetal (SAF)	21
2 Incidência da SAF nos Estados Unidos.....	22
3 Figura esquemática indicando a trajetória da migração tangencial	25
4 Principais pistas moleculares envolvidas na migração tangencial	27
5 Transição da atividade do GABA de excitatório para inibitório.....	30
6 Provável atividade dos receptores de GABA na migração neuronal	32
7 Comparação morfológica de encéfalos controle e alcoolizado.....	59
8 Gel de <i>Western Blot</i> para a GAD65/67.....	60
9 Fotomicrografia de baixo aumento para imunohistoquímica para GABA .	61
10 Imunohistoquímica para GABA na eminência ganglionar lateral (EGL).....	63
11 Imunohistoquímica para GABA ao nível do córtex cerebral.....	63
12 Imunohistoquímica para GABA de encéfalos em grande aumento	64
13 Imunofluorescência para GABA na eminência ganglionar lateral.....	64
14 Imunohistoquímica para GABA ao nível do hipocampo.....	65
15 Imunohistoquímica para calretinina em cortes coronais rostrais.....	65
16 Imunohistoquímica para GABA em córtex parietal pós-natal.....	66
17 Marcação de TUNEL em encéfalo alcoolizado ao nível da EGL	68
18 Marcação de TUNEL em encéfalo alcoolizado ao nível do córtex.....	68
Gráfico	Página
1 Concentrações plasmáticas de etanol.....	58
2 Densitometria dos dados de <i>Western Blot</i> e estatística	61
3 Valores médios e estatística do deslocamento na periferia da arena	69
4 Valores médios e estatística do deslocamento no centro da arena.....	69
5 Valores médios e estatística de atividade exploratória (<i>rearing</i>)	70
6 Valores médios e estatística de estimulação das vibrissas (<i>grooming</i>)....	71
7 Valores médios e estatística do depósito de fezes.....	72
Tabela	Página
1 Densidade média da marcação de TUNEL e estatística	67

LISTA DE ABREVIACÕES

AEP: área entopeduncular

AMPA: ácido α metil fosfono valérico

BO: bulbo olfatório

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain derived neurotrophic factor*

BrdU: 5-Bromo-2'-deoxiuridina

BSA: albumina do soro bovino, do inglês *bovine serum albumin*

CON: grupo de animais não alcoolizados expostos apenas ao veículo

CTX: neocórtex

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

E: dia embrionário

EGC: eminência ganglionar caudal

EGL: eminência ganglionar lateral

EGM: eminência ganglionar medial

ETOH: grupo de animais expostos ao etanol

GABA: ácido γ -amino-butírico

GAD: descarboxilase do ácido glutâmico, do inglês *glutamic acid decarboxylase*

GFP: proteína fluorescente verde, do inglês *green fluorescent protein*

HGF: fator de crescimento de hepatócitos, do inglês *hepatocyte growth factor*

NGF: fator de crescimento do nervo, do inglês *nerve growth factor*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NT: neurotrofina

P: dia pós-natal

PBS: tampão fosfato em salina, do inglês *phosphate buffer saline*

PC: placa cortical

PFA: paraformaldeído

PIB: produto interno bruto

SAF: síndrome alcoólica fetal

SNC: sistema nervoso central

SP: subplaca

TGF: fator de transformação de crescimento, do inglês *transforming growth factor*

TTBS: tampão tris salina

VL: ventrículo lateral

ZI: zona intermediária

ZM: zona marginal

ZP: zona proliferativa

ZSV: zona subventricular

ZV: zona ventricular

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA, CONCEITOS E PROBLEMÁTICA DO ÁLCOOL

O etanol, também conhecido como álcool, é considerado a única droga comum a todas as civilizações (VAILLANT, 1983), e sua utilização data desde o período neolítico, com o início do desenvolvimento da agricultura e da invenção da cerâmica (VIALA-ARTIGUES & MECHETTI, 2003a). As dificuldades na conservação de alimentos e bebidas propiciaram o uso da fermentação alcoólica natural, como foi o caso do vinho, uma bebida derivada da fermentação do suco da uva (MCGOVERN & PATRICK, 2007). Este processo, entretanto, produzia bebidas com baixo teor alcoólico. Os celtas, gregos, romanos, egípcios e babilônios registraram de alguma forma o consumo e a produção de bebidas alcoólicas (PURCELL, 2003; VIALA-ARTIGUES & MECHETTI, 2003a, b). Portanto, o uso de álcool e seus efeitos comportamentais alucinantes são encontrados desde as antigas civilizações (VAILLANT, 1983).

Posteriormente, deu-se origem ao processo de destilação e começaram a surgir as primeiras bebidas de maior teor alcoólico. Durante a revolução industrial as bebidas alcoólicas passaram a ser produzidas em larga escala, o que aumentou consideravelmente seu consumo na sociedade (VIALA-ARTIGUES & MECHETTI, 2003b).

A utilização de álcool também teve importância na prática médica. A ingestão de álcool como droga analgésica foi usada em procedimentos cirúrgicos e quase persistiu como método farmacêutico se não fosse seu efeito tóxico expressivo. Mesmo em tempos antigos, o abuso de álcool e a embriaguez alcoólica já eram severamente censurados pelos povos greco-romanos (VIALA-ARTIGUES &

MECHETTI, 2003a). É compreensível que comportamentos de euforia e a dependência química causados pelo álcool sejam fatores que contribuem para a ingestão continuada de bebidas alcoólicas até os dias de hoje (JEROME, 1993).

Por definição, alcoolismo é o conjunto de problemas relacionados ao consumo excessivo e/ou prolongado de álcool; também é entendido como o vício de ingestão excessiva e regular de bebidas alcoólicas e suas conseqüências. Alcoolismo também se refere a diagnósticos, tais como a dependência, a abstinência, o abuso (uso excessivo, porém não continuado) e a intoxicação por álcool (embriaguez) (JEROME, 1993). De acordo com o Centro de Controle de Intoxicações da UNICAMP, concentrações alcoólicas de 20 a 120 mg/dL no sangue podem causar desde leve incoordenação até alteração da personalidade, 200 mg/dL causa vômito, confusão mental e andar cambaleante, 300 mg/dL é a transição entre a intoxicação moderada e severa, situação em que o indivíduo apresenta fala arrastada e distúrbios visuais, 400 mg/dL causa hipoglicemia, perda da memória e convulsões, e 700 mg/dL é potencialmente letal, causando inconsciência e falência respiratória.

A prevalência de alcoolismo é preocupante em todos os países, independente de classe social, condição financeira ou nível cultural. Um indivíduo sob efeito do álcool pode se tornar agressivo, prejudicar o bem estar de seus semelhantes e até causar a morte. Isto é o que ocorre em acidentes automobilísticos seguidos de morte (mais de 1000 óbitos ao ano no Brasil) provocados por motoristas alcoolizados. Conforme estabelecido pelo Código Nacional de trânsito, a concentração alcoólica de 60 mg/dL comprova que um condutor de veículo está embriagado, o que corresponde à aproximadamente duas latas de cerveja ou dois copos de vinho, ou ainda uma dose de destilado (30 mL de etanol).

Embora alguns considerem a falta de controle do consumo excessivo de álcool por parte dos órgãos competentes, vale lembrar que mais de um décimo do PIB (produto interno bruto) no Brasil é arrecadado através da produção e comercialização de bebidas alcoólicas. Entretanto, não se pode estimar com precisão, o quanto deste faturamento poderia suprir os gastos necessários para a reinserção de alcoólatras na sociedade.

Entre as substâncias conhecidas como teratogênicas (que podem causar anomalias), o álcool é, provavelmente, a mais estudada. As primeiras demonstrações da ação do álcool em nível celular foram realizadas em linfoblastos; atualmente os neurônios têm recebido atenção especial em estudos sobre alcoolismo (NAGY *et al.*, 2001; MILLER 2006; KUMADA *et al.*, 2007). Componentes de tecido cerebral sofrem influência direta do álcool e quase sempre seu efeito é dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de álcool, maior a toxicidade. Entretanto, existem raras exceções de efeito bifásico, como os receptores de NMDA, por exemplo, que podem ser insensíveis a doses intoxicantes e afetados a baixas concentrações de etanol (LOVINGER *et al.*, 1989; CROWDER *et al.*, 2002). Outro dado interessante é a retirada de etanol em casos de alcoolismo crônico, podendo induzir a neurotoxicidade (NAGY *et al.*, 2001). A alteração das estruturas telencefálicas durante o desenvolvimento, entretanto, indicam tanto um efeito dose-dependente como tempo-dependente à exposição alcoólica. Uma análise mais detalhada da literatura especializada é feita a seguir.

1.2. ALCOOLISMO E SÍNDROME ALCOÓLICA FETAL (SAF)

Se administrarmos álcool em dois indivíduos de sexos opostos na mesma dose ajustada de acordo com o peso corpóreo, a mulher apresentará níveis

alcoólicos mais elevados no sangue do que no homem (MATTSON *et al.*, 1997). Isto se deve porque as fêmeas possuem menor quantidade de água e maior proporção de tecido gorduroso no corpo quando comparado aos homens de peso corporal semelhante. Entretanto, as mulheres parecem eliminar mais rapidamente o álcool do sangue do que os homens, porque elas têm maior volume de fígado por unidade de massa corporal seca. Como o álcool é metabolizado quase que completamente pelo fígado, as mulheres acabam eliminando-o mais rapidamente (MATTSON *et al.*, 1997). Mas as variações na absorção de álcool também podem estar relacionadas ao ciclo menstrual, diferenças hormonais e de concentração gástrica da desidrogenase alcoólica (enzima crucial para o metabolismo do álcool). Por essas razões, as mulheres ficam embriagadas com doses mais baixas e progridem mais rapidamente para o alcoolismo crônico e suas complicações médicas (GALDURÓZ & CAETANO, 2004).

A idade onde se encontra a maior incidência de alcoolismo feminino está entre 26 e 34 anos, principalmente entre mulheres separadas (GALDURÓZ & CAETANO, 2004) já que estas são mulheres jovens e ativas, comumente desprovidas de boa estrutura familiar e sócio-econômica. O fato das mulheres beberem socialmente, sem conscientização ou por desconhecimento dos efeitos de se ingerir álcool de forma descontrolada, leva-as ao grupo de risco do alcoolismo. Muitas mulheres grávidas, por não planejarem a concepção e gestação, acabam expondo seus bebês à intoxicação alcoólica gestacional. A bebida alcoólica ingerida pela gestante atravessa a barreira placentária e faz com que o feto esteja exposto às mesmas concentrações de álcool do sangue materno. Porém, a exposição fetal é maior, devido ao metabolismo e eliminação do álcool serem mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado de etanol (CHAUDHURI, 2000).

Estima-se que 30 a 40% dos recém-nascidos de mães alcoólatras apresentam uma combinação de defeitos de crescimento e/ou desenvolvimento do cérebro (SOKOL *et al.*, 2003). Estima-se que 11,2% da população brasileira seja dependente de bebidas alcoólicas (GALDURÓZ & CAETANO, 2004), o que propicia a incidência de alcoolismo fetal.

O conceito de que o álcool afeta a formação do sistema nervoso central vem desde o início da década de 70 (JONES & SMITH, 1973; JONES *et al.*, 1973). A síndrome alcoólica fetal (SAF) provoca retardo no crescimento e anormalidades neurológicas (hidrocefalia, agenesia do corpo caloso, heterotopias neuro-gliais, displasia cerebral e microcefalia). Também são observadas malformações faciais, defeitos de visão e audição, bem como problemas de linguagem com dificuldades de aprendizado e memória, manutenção da atenção e capacidade de solucionar problemas. Tais alterações também representam desvios de comportamento com dificuldade de relacionamento interpessoal (HIRAI *et al.*, 1999). Os aspectos cranio-faciais da SAF em humanos podem ser observados na Figura 1.



Figura 1: Ilustração esquemática das alterações craniofaciais observadas em indivíduos com síndrome alcoólica fetal (SAF). Estas características indicam comprometimento na formação do crânio visceral. Modificado do endereço eletrônico <http://geocities.com/ssaidemb/alcoholism.html>.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas em modelos animais com o objetivo de reduzir os impactos causados pela SAF, uma vez que o consumo de álcool

durante a gestação é a principal causa de retardo mental nos Estados Unidos (SOKOL *et al*, 2003). A microcefalia está presente em praticamente todos os casos (RILEY *et al*, 1995; ARCHIBALD *et al*, 2001; SOWELL *et al*, 2001a e 2001b; BHATARA *et al*, 2002) e este crescimento alterado do cérebro é acompanhado por atraso no desenvolvimento neurológico em 90% dos casos (MARCUS, 1987). Múltiplos aspectos do desenvolvimento podem ser afetados, incluindo o desenvolvimento do prosencéfalo, proliferação, migração e diferenciação neurais bem como a formação de sinapses (KUMADA *et al*, 2007). Atualmente, estima-se que 9% das mulheres brasileiras são alcoólatras, (<http://www.acaoantidrogas.hpg.ig.com.br/alcool.htm>), o que em muitas vezes em período gestacional podem gerar filhos candidatos à síndrome. Segundo a organização mundial da saúde (OMS), a cada ano, 12.000 bebês no mundo nascem com SAF e a estatística oscila entre 0,4 e 3,1 casos em 1000 nascimentos. A incidência da SAF varia com a população estudada (LARROQUE, 1992), e os dados nos Estados Unidos são bastante completos (Figura 2).

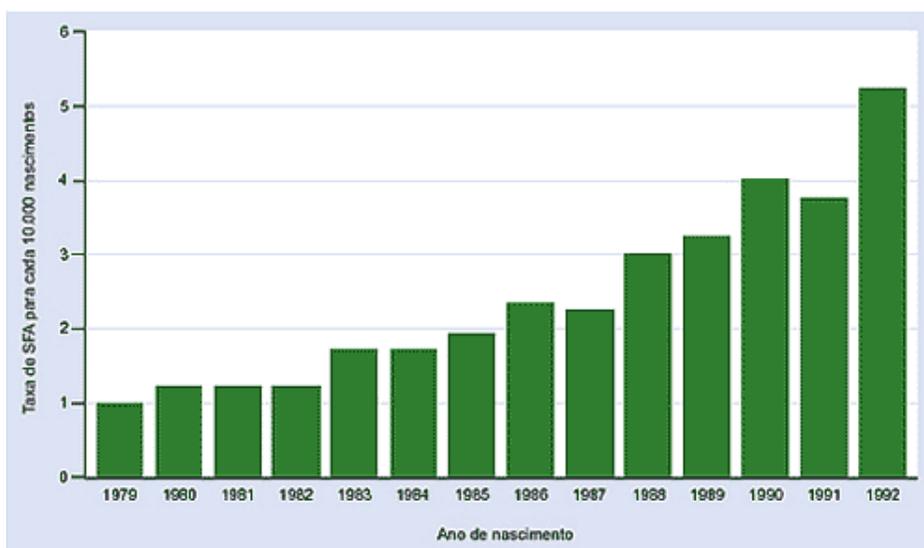


Figura 2: Incidência da SAF nos Estados Unidos nos anos de 1979 a 1992. Modificado de Alcohol Health & Research World 1994 18(1). National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism - NIAAA.

Alguns sintomas podem não ser óbvios até que o bebê complete a idade entre 3 e 4 anos. Em palavras coloquiais, a síndrome pode ser descrita como um "invólucro permanente" para o bebê no qual seu crescimento é retardado, sua capacidade intelectual reduzida (QI \leq 70% do normal detectado antes dos 18 anos) e apresenta maior risco de morrer durante a infância (MATTSON *et al.*, 1997).

Os dois grandes eventos prejudicados no desenvolvimento em modelos de alcoolismo na gestação são: a migração, que geralmente se torna aberrante, e a proliferação celular, que se torna diminuída (HIRAI *et al.*, 1999). Em modelos *in vitro*, que se propõem a simular os efeitos da SAF, observa-se retardo na proliferação celular em culturas neocorticais embrionárias tratadas com álcool (JACOBS & MILLER, 2001), podendo aumentar a morte celular na zona marginal e, de forma mais pronunciada, na placa cortical, o que prejudica a migração e/ou a sobrevivência neuronal (MOONEY & MILLER, 2003).

Os efeitos do etanol no feto podem variar entre uma regulação local sobre sistemas neuroquímicos e sinapses, até um efeito mais dramático onde se observa morte neuronal com perda de função. Os receptores de NMDA oferecem grande parte da chave para o entendimento dos mecanismos pelo qual o etanol altera o desenvolvimento do sistema nervoso central fetal. A transmissão glutamatérgica mediada por receptores de NMDA é essencial para o desenvolvimento do encéfalo. Quando o etanol é administrado cronicamente no período pré-natal e nas primeiras semanas pós-natal, observa-se inibição da transmissão mediada por receptores de NMDA (DIAZ *et al.*, 1997); através da inibição de receptores de NMDA, o álcool promove apoptose neuronal pela inibição dos efeitos tróficos do NMDA (BHAVE & HOFFMAN, 1997). Portanto, os sistemas excitatórios desenvolvem importante papel

na fisiopatologia da síndrome alcoólica fetal e estão relacionados aos déficits de aprendizagem e memória em crianças portadoras da SAF.

1.3. DESENVOLVIMENTO NORMAL DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS GABAÉRGICAS CORTICAIS

Durante a formação do cérebro, neurônios e gliócitos organizam-se de forma complexa para processarem informações através de atividade eletroquímica.

Antes de entendermos os distúrbios causados pelo álcool em cérebros embrionários, é necessário saber que dois tipos principais de neurônios dão origem às camadas corticais durante o desenvolvimento normal: 1) neurônios de projeção, glutamatérgicos, originados principalmente em zonas proliferativas telencefálicas dorsais (CHAN *et al.*, 2001; LETINIC *et al.*, 2002), os quais utilizam a glia radial como substrato para migrarem radialmente (RAKIC, 1972) e 2) interneurônios GABAérgicos, derivados de zonas proliferativas telencefálicas ventrais, que migram tangencialmente à pia-máter, para atingirem seus alvos corticais no telencéfalo dorsal (ANDERSON *et al.*, 1997; MARÍN & RUBENSTEIN, 2001; ANG *et al.*, 2003; MARÍN & RUBENSTEIN, 2003; SHU *et al.*, 2004). Pode-se visualizar melhor este modo de migração com o auxílio da Figura 3.

A eminência ganglionar medial (EGM) é a principal fonte dos interneurônios GABAérgicos corticais (MARIN *et al.*, 2001), embora sejam descritas células migrando tangencialmente da eminência ganglionar lateral (EGL) e do subpálio (MARÍN & RUBENSTEIN, 2003).

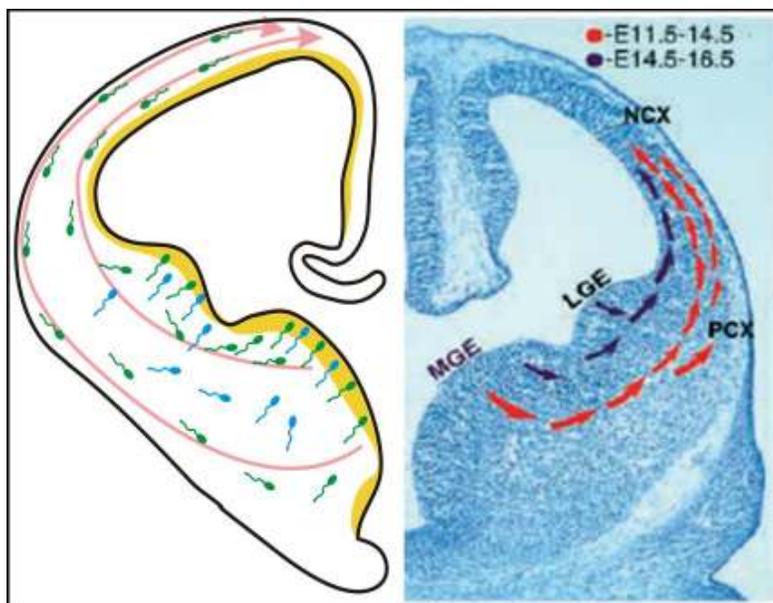


Figura 3: Esquema de corte coronal de encéfalos embrionários indicando a trajetória das células precursoras GABAérgicas das eminências ganglionares para o córtex dorsal. Há duas correntes migratórias distintas de acordo com o período do desenvolvimento. Modificado de Anderson *et al.*, 2001 e Schanuel, 2004.

Uma vez que os neurônios migrantes tangenciais atingem o córtex dorsal, devem então, realizar a etapa final da migração tangencial que é direcionada para o ventrículo. Diz-se que neste momento os interneurônios mergulham (migram) em direção à zona ventricular em busca de sinais que os orientam para migrarem até seus alvos corticais apropriados (MARKRAM *et al.*, 2004). Sabe-se que a migração de interneurônios dentro do córtex é neuronofílica (com neurônios de projeção de mesma idade ou células de Cajal-Retzius) ou gliofílica (comunicação com a glia radial) (VALCANIS & TAN, 2003). Com isto, acredita-se que células piramidais e células GABAérgicas nascidas num mesmo período podem residir na mesma camada cortical (HEVNER *et al.*, 2004).

Utilizando-se critérios imuno-histoquímicos, as células GABAérgicas podem ser subdivididas em 3 subpopulações, as que co-expressam as proteínas ligadoras de cálcio: calretinina, parvalbumina ou calbindina. Alguns trabalhos sugerem

dispersão preferencial de células que expressam tais proteínas e GAD (LÓPEZ-BENDITO *et al.*, 2004; YOZU *et al.*, 2004). Quase todas as células migrantes tangenciais, que expressam a GAD65, alojam-se preferencialmente nas camadas II/III do córtex cerebral e co-expressam calretinina (LÓPEZ-BENDITO *et al.*, 2004). Outros trabalhos revelam que a via migratória tangencial é a fonte de células GABAérgicas e calbindina positivas no neocórtex (ANDERSON *et al.*, 1997; TAMAMAKI *et al.*, 1997; LAVDAS *et al.*, 1999).

A rota e o destino dos interneurônios GABAérgicos nas diferentes camadas corticais está relacionado ao período de geração destas células. A Figura 3 ilustra as duas principais rotas migratórias tangenciais, uma mais superficial ocorrendo em estágios precoces (E11,5 - E14,5), e outra mais profunda que acontece a partir de E14,5 (MARÍN & RUBENSTEIN *et al.*, 2001). Neste estágio as células migram, predominantemente, através da zona intermediária e, posteriormente, aparecem na porção inferior da zona intermediária e zona subventricular (JIMENEZ *et al.*, 2002).

Estudos em camundongos sugerem que a subpopulação parvalbumina positiva seja proveniente da EGM, enquanto que aquelas que expressam calretinina originam-se em E12,5 (YOZU *et al.*, 2004) e derivam, principalmente, da eminência ganglionar caudal (WICHTERLE *et al.*, 2001; VALCANIS & TAN, 2003; XU *et al.*, 2004) e das porções mais rostrais do telencéfalo ventral (BYSTRON *et al.*, 2006) podendo ser mais direcionadas às camadas II/III do córtex cerebral (YOZU *et al.*, 2004). Outros autores demonstram que em estágios iniciais do desenvolvimento do sistema GABAérgico (E12), as células originadas na EGM inervam principalmente a pré-placa e apresentam características típicas de células de Cajal-Retzius (VALCANIS & TAN, 2003).

Estudos com registros de monitoramento em vídeo-câmera demonstram que a velocidade das células da EGC (109 $\mu\text{m}/\text{h}$) é aproximadamente duas vezes mais rápida do que na EGM (50-60 $\mu\text{m}/\text{h}$) (POLLEUX *et al.*, 2002) e várias moléculas podem sinalizar e organizar a migração desses precursores para o córtex cerebral (LEVITT, 1998; MARÍN *et al.*, 2001). Enquanto algumas moléculas sinalizam a repulsão, outras moléculas podem servir como atratoras, ou ainda uma mesma molécula pode desempenhar função atratora e repulsora em diferentes regiões e períodos do desenvolvimento.

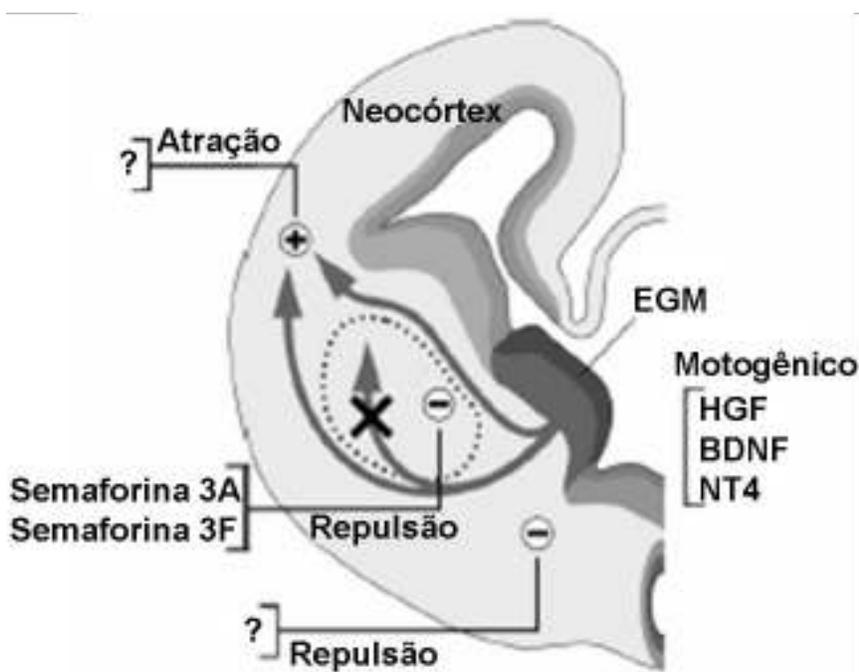


Figura 4: Ilustração esquemática de encéfalo embrionário mostrando as principais pistas moleculares envolvidas na migração tangencial a partir das eminências ganglionares. Modificado de Marín & Rubenstein, 2003.

Os fatores relacionados à migração tangencial ainda são pouco conhecidos. Quando um fator é capaz de estimular ou iniciar a motilidade e migração celular, diz-se que ele é motogênico (DENAXA *et al.*, 2001; YAU *et al.*, 2003). A Figura 4 indica alguns fatores com provável ação motogênica sobre os interneurônios migrantes. Neurotrofinas tais como BDNF, neurotrofina-4 e fator neurotrófico de linhagem de

células gliais (GDNF) são considerados potentes fatores motogênicos que estimulam a migração de interneurônios corticais (POLLEUX *et al.*, 2002; POZAS & IBANEZ, 2005; MARIN *et al.*, 2001; ALIFRAGIS *et al.*, 2004). Sugere-se que a sinalização por neuropilina, semaforina e Robo1 são requeridos para orientar os interneurônios em torno do corpo estriado e para dentro do neocórtex. Entretanto, embora Lhx6 seja importante para a migração de células da EGM, este não interfere no fenótipo dos interneurônios em produzir GABA e GAD (LAVDAS *et al.*, 1999; ALIFRAGIS *et al.*, 2004), sugerindo que estes precursores possuem um programa pré-determinado ao fenótipo de acordo com sua procedência.

1.4. SISTEMA GABAÉRGICO E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO

O ácido γ -amino-butírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro de mamíferos adultos, é sintetizado por 20 a 30% de todos os neurônios e está presente em 60 a 70% das sinapses, contrabalançando a ação dos sistemas excitatórios (revisado por VARJU *et al.*, 2001a). O GABA exerce sua principal função inibitória através da ativação dos receptores GABA_A e GABA_C (ionotrópicos) e GABA_B (metabotrópico). Os dois primeiros são complexos receptor-canal iônico, enquanto o segundo está acoplado à proteína G, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular.

No sistema nervoso de vertebrados, a síntese de GABA é catalisada pela enzima descarboxilase de ácido glutâmico (GAD, revisado por MARTIN & RIMVALL, 1993). Existem duas isoformas de GAD já identificadas: uma com 65 kDa (GAD65) e outra com 67 kDa (GAD67). Cada isoforma difere no peso molecular, seqüência de aminoácidos, localização intracelular (KANAANI *et al.*, 1999), interação com co-fator (KAUFMAN *et al.*, 1986) e nível de expressão entre as diversas áreas do cérebro

(JULIEN *et al.*, 1987). As duas isoformas de GAD são distribuídas de maneira diferente nos neurônios. GAD65 é mais concentrada nos terminais nervosos e possivelmente está associada a vesículas sinápticas (KANAANI *et al.*, 1999), enquanto a GAD67 é encontrada uniformemente no citoplasma, sendo facilmente detectada no corpo celular e dendritos (SHEIKH & MARTIN, 1996).

Camundongos geneticamente modificados, nos quais os genes da GAD 67 ou da GAD 65 foram nocauteados, apresentam fenótipos distintos (CONDIE *et al.*, 1997). Animais deficientes em modular GAD67 apresentam morte neonatal. Os níveis de GABA são reduzidos em camundongos GAD67+/-, indicando que a GAD65 não compensa a perda parcial da outra isoforma. Entretanto, camundongos GAD65-/- são viáveis, porém desenvolvem epilepsia e alteração de comportamento (CONDIE *et al.*, 1997). Já os camundongos nocauteados para ambas as enzimas (GAD 65/67), apresentam fenótipo semelhante aos deficientes em GAD67 (CONDIE *et al.*, 1997).

A observação de encéfalos embrionários também é marcada pela formação precoce de neurônios GABAérgicos e pode ser detectada por marcadores específicos para GAD (DUPUY & HOUSER, 1996) e GABA (ROZENBERG *et al.*, 1989). Curiosamente, Obata e colaboradores (1978) estudaram a medula espinhal e relataram uma mudança na ação do GABA durante o desenvolvimento. Atualmente, sabe-se que a ação inicial do GABA no SNC imaturo é excitatória, incluindo as regiões neocorticais (revisto por BEN-ARI *et al.*, 2007). Estas diferenças da atividade GABAérgica no desenvolvimento são claramente devido às concentrações de íons cloreto no meio intracelular de neurônios imaturos e maduros (BEN-ARI *et al.*, 2007). Isto ocorre porquê a ausência da expressão de KCC2 (um transportador de íons cloreto) em neurônios imaturos resulta em despolarização com aumento

deste íon no meio intracelular. Por outro lado, neurônios maduros expressam KCC2 que promovem o transporte ativo de íons cloreto e hiperpolarização. A Figura 5 ilustra a transição da ação do GABA ao longo do desenvolvimento.

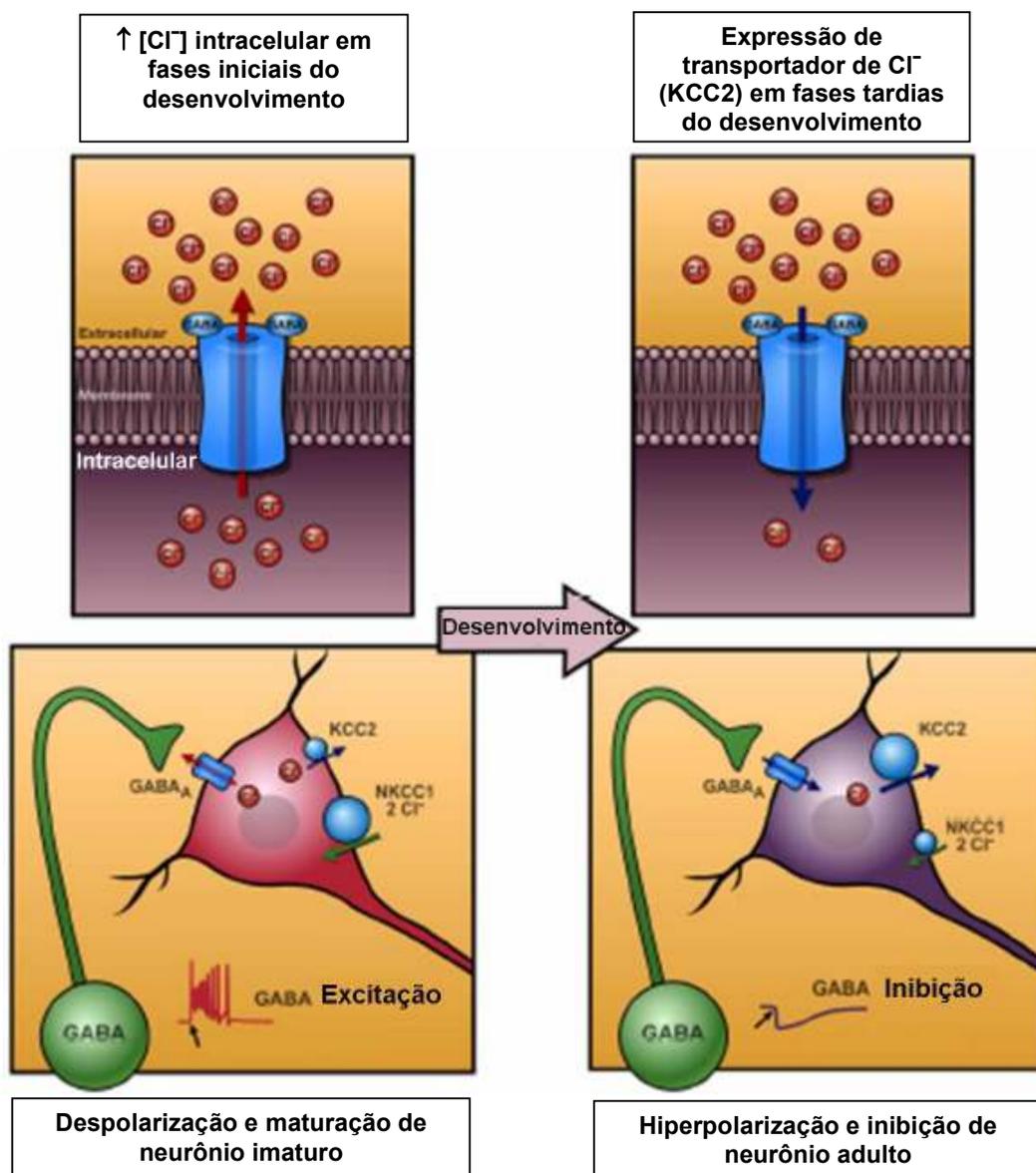


Figura 5: Ilustração esquemática de transição da atividade do GABA durante o desenvolvimento. Indicados: GABA excitatório no embrionário e inibitório no adulto. Adaptado de Ben-Ari *et al.*, 2007.

Em estágios precoces do desenvolvimento em roedores, os neurônios que acabam de nascer migram para a placa cortical e já apresentam atividade sináptica

espontânea, das quais a maioria são GABAérgicas (LO TURCO *et al.*, 1991, 1995; OWENS *et al.*, 1999; OWENS & KRIEGSTEIN, 1999; 2002). A mudança da ação do GABA de excitatório para inibitório ocorrem somente entre os dias pós-natais P5 e P7 na formação hipocampal de ratos (BEN-ARI, *et al.*, 1989; revisão de BEN-ARI *et al.*, 2007).

Sugere-se que o GABA pode ser liberado em todas as partes do neurônio em desenvolvimento por secreção não vesicular, um tipo de liberação parácrina através de uma reversão de transportadores (YAN & RIBAK, 1998). Em neurônios prosencefálicos ao nascimento, também há liberação de GABA dos cones de crescimento sem estar associado a vesículas sinápticas (TAYLOR *et al.*, 1990).

A despolarização de membrana induzida por GABA em neurônios embrionários e neonatais também ativam canais de cálcio aumentando a concentração intracelular e facilitando a abertura de receptores do tipo NMDA (OWENS & KRIEGSTEIN, 2002). Tais observações sugerem que o GABA poderia influenciar a motilidade celular via mudanças do transiente de cálcio em neurônios migrantes. Sabe-se que é necessário alterar o cálcio intracelular para que haja mudanças do citoesqueleto, indispensáveis para a mobilidade e migração neurais (KOMURO & RAKIC, 1998). O crescimento de neuritos também é influenciado pela ativação do receptor GABA_A em vários sistemas (BARDIN *et al.*, 1993; MARTY *et al.*, 1996; MARIC *et al.*, 2001; TAPIA *et al.*, 2001; BORODINSKY *et al.*, 2003) e parece ser crítica para a maturação morfológica de neurônios corticais *in vivo* (CANCEDDA *et al.*, 2007).

Vários estudos descrevem um provável envolvimento do sistema GABAérgico embrionário na formação do córtex cerebral e na migração radial via receptores de GABA (RICKMANN *et al.*, 1977; MILLER, 1986; revisto por BEN-ARI, *et al.*, 2007).

Os receptores GABA_A e GABA_C estão mais relacionados à migração neuronal das zonas proliferativas para a zona intermediária, enquanto que os receptores GABA_B estão envolvidos na migração da zona intermediária para a placa cortical (BEHAR *et al.*, 1996, 1998, 2000, 2001; revisões, LUJÁN *et al.*, 2005; BEN-ARI *et al.*, 2007), como pode ser observado na Figura 6.

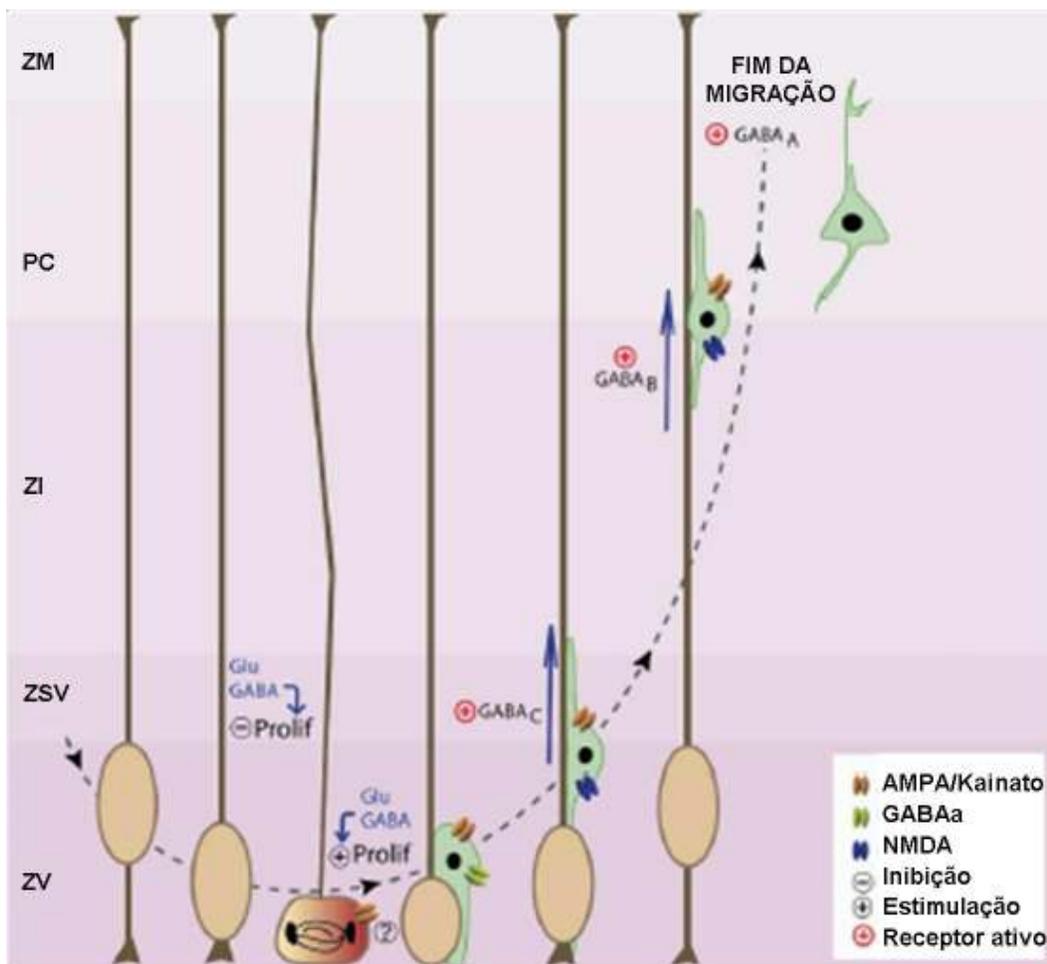


Figura 6: Figura esquemática ilustrando o papel provável dos receptores de GABA na migração durante o desenvolvimento cortical. Modificado de Luján *et al.*, 2005.

Especificamente, em fatias organotípicas neocorticais de embriões E18 - E19, a bicuculina (um antagonista GABAérgico) aumenta a velocidade de migração, sugerindo uma ação inibitória do GABA sobre a migração (HECK *et al.*, 2007).

Similarmente, em fatias corticais embrionárias de ratos, a bicuculina aumenta a migração de neurônios em E18 (BEHAR *et al.*, 2000). Outros autores observaram que concentrações baixas de GABA aplicadas diretamente em fatias de cérebro reduz a taxa de migração celular, enquanto que a bicuculina aumenta a migração dos precursores de neurônios da zona subventricular anterior e da corrente migratória rostral (BOLTEUS & BORDEY, 2004).

Existem algumas evidências sobre a influência do GABA na síntese de DNA nos precursores de células neocorticais. A ativação de GABA nas zonas proliferativas neocorticais diminui a síntese de DNA e reduz o número de células marcadas com BrdU (LOTURCO *et al.*, 1995). Entretanto, tais efeitos parecem ser específicos para cada estrutura cerebral. GABA aumenta o número de células marcadas com BrdU na zona ventricular, mas diminuiu na zona subventricular (RAYDAR *et al.*, 2000). Os mecanismos de liberação e os sinais intracelulares, entretanto, ainda não foram determinados.

Em relação ao modo de migração tangencial, López-bendito e colaboradores (2003) investigaram o papel dos receptores GABA_B utilizando células marcadas com um traçador em fatias embrionárias de cérebro. Os autores demonstraram que um antagonista do receptor GABA_B produz acúmulo dose-dependente de neurônios migrando tangencialmente nas zonas ventricular e subventricular cortical bem como prolongamento líder mais curto (LÓPEZ-BENDITO *et al.*, 2003). Este dado corrobora com a hipótese de que a migração tangencial pode ser afetada via alteração da atividade de receptores específicos do sistema GABAérgico.

Por outro lado, ainda não há um consenso na literatura, já que Manent e colaboradores (MANENT *et a.*, 2006) afirmam que os interneurônios migrando tangencialmente expressam receptores de AMPA, mas não os receptores de GABA

e do tipo NMDA. Outros trabalhos já mostram que o bloqueio ou a ativação dos receptores do tipo NMDA retardam e aumentam a migração celular, respectivamente. Este dado sugere que a migração tangencial pode sofrer influência de vários receptores que não somente os de GABA e podem modular tanto as células piramidais como os interneurônios durante a migração (KOMURO & RAKIC, 1993; MANENT *et al.*, 2005).

1.5. ETANOL E NEUROGÊNESE

Embora vários trabalhos investiguem os efeitos do alcoolismo fetal sobre a proliferação neuronal durante a formação do encéfalo, sabe-se que os efeitos são específicos e dose-dependente. Um único episódio de alcoolismo pode inibir a proliferação, sem causar impacto significativo à sobrevivência de células recém-geradas (OBERNIER *et al.*, 2002 a, b), sugerindo que a neurogênese pode ser mais sensível que a morte celular em determinados insultos provocados pelo álcool.

De maneira geral, os trabalhos de Miller (1986, 1987 e 1993) demonstram, aproximadamente, 1-2 dias de atraso no nascimento de ratos alcoolizados cronicamente a partir de E5. Parte desse atraso é devido à permanência mais prolongada das células pós-mitóticas na zona proliferativa antes de iniciar a migração, o que contribui para o tamanho aumentado da zona subventricular, sem alterar, entretanto, o número de neurônios iniciando a migração (fração de saída das células) (MILLER, 1989). Mais especificamente, na primeira metade do período de neurogênese neocortical, a produção neuronal diária em roedores é diminuída pela exposição pré-natal em alcoolismo crônico (MILLER, 1986, 1988). Durante este período, a zona ventricular é a zona proliferativa neocortical majoritária e as células proliferantes, sob efeito do etanol, despendem maior tempo para completar o ciclo

celular (MILLER E NOWAKOWSKI, 1991). Em períodos mais tardios, entretanto, quando a zona subventricular torna-se a principal zona proliferativa, o etanol passa a ter maior efeito sobre esta em relação à zona ventricular (MILLER, 1989; MILLER E NOWAKOWSKI, 1991). A proliferação celular na zona subventricular e a produção de neurônios gerados mais tardiamente somente são afetadas pelo etanol entre E18 e E21. Já a proliferação das células na zona ventricular 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 zona ventricular é mais proeminente. Esta exposição ao etanol inibe a proliferação na zona ventricular e reduz o número de neurônios gerados em E15 (MILLER, 1996a). Em outros trabalhos, o número total de células na zona subventricular e o número de células em ciclo celular são aumentados com o etanol (MILLER, 1989; MILLER E NOWAKOWSKI, 1991).

As células do hipocampo em desenvolvimento também são afetadas pela exposição ao etanol. Os neurônios da formação hipocampal de ratos são gerados desde E15 até a idade adulta (ALTMAN, 1962; ANGEVINE, 1965; SCHLESSINGER *et al*, 1978; BAYER, 1980; MILLER, 1995a). A maior parte dos neurônios granulares ($\approx 85\%$) no giro denteado, entretanto, são gerados no período pós-natal na zona subgranular ou CA4. Estudos anatômicos demonstram que a exposição pré-natal crônica ao etanol diminui o número total de neurônios em CA1, tendo pouco impacto sobre o número neuronal no giro denteado (MILLER, 1995a). Quando o tratamento é pós-natal crônico, observa-se um aumento no número total de neurônios do giro denteado e nenhum efeito nas células em CA1.

O impacto do alcoolismo pré-natal sobre a proliferação das eminências ganglionares, que são as zonas progenitoras dos interneurônios GABAérgicos, vem

sendo estudado *in vivo*, em nosso laboratório e está em fase de conclusão, como parte deste projeto sendo tema de dissertação de Mestrado de Lima (2008). Segundo os autores, há aumento da zona proliferativa, da velocidade do ciclo celular na zona ventricular e aumento do número de células ciclando na zona ventricular e subventricular da EGM no grupo alcoolizado. Na EGL, há aumento no número de células ciclando na zona subventricular de embriões alcoolizados. Além disso, na EGC há redução da zona ventricular, aumento de células ciclando nesta região, sem afetar o número de células em ciclo celular (LIMA, 2008).

1.6. ETANOL E MORTE CELULAR

A morte neuronal é um processo natural no desenvolvimento do SNC (MARTIN, 2001; LOSSI E MERIGHI, 2003) e afeta neurônios proliferantes, pós-mitóticos e pós-migratórios. A quantidade de morte neuronal varia com o tempo, localização, e tipo de célula (MILLER, 1995). A quantidade de morte neuronal no sistema nervoso pode variar de 20 a 80% sendo vulneráveis de acordo com a localização e o estado de maturação dos neurônios. Durante o desenvolvimento embrionário, observa-se a importância da morte celular programada como um fenômeno fisiológico regressivo regulado geneticamente (ELLIS *et al.*, 1991; CLARKE & CLARKE, 1996). A apoptose é a forma de morte celular programada mais conhecida, caracterizada por redução do tamanho nuclear, condensação de cromatina e fragmentação de DNA (WYLLIE *et al.*, 1984). Este programa, entretanto, pode ser disparado, também, por estímulos não fisiológicos e fatores deletérios ao organismo. No córtex cerebral, a morte neuronal pode depender da lâmina e tipo de neurônio analisado (MILLER, 1995a).

Estudos *in vivo* demonstram que o etanol afeta o padrão espaço-temporal de morte neuronal no sistema nervoso. As estruturas mais estudadas são: o núcleo sensitivo do nervo trigêmeo, o cerebelo, a formação hipocampal e o neocórtex. No primeiro caso, as malformações craniofaciais da SAF são acompanhadas de altos índices de morte neuronal do nervo trigêmeo (JONES & SMITH, 1973a; 1973b; ASTLEY *et al.*, 1999). O mesmo ocorre no cerebelo, provocando redução de tamanho dessa estrutura em embriões alcoolizados (DIAZ & SAMSON, 1981; WEST *et al.*, 1989) onde as células de Purkinje são os principais alvos de expressão da caspase-3 ativada e da marcação de TUNEL (LIGHT *et al.*, 2002), seguido de neurônios granulares (LIESI, 1997). No hipocampo, entretanto, a quantidade de DNA não é afetada após exposição pré-natal ao álcool, podendo até mesmo ser aumentada com a exposição pós-natal (MILLER, 1996b). Além disso, estudos anatômicos demonstram redução no número de neurônios no hipocampo expostos ao álcool pré-natal (MILLER, 1995c).

No córtex cerebral, a morte celular tem papel crucial na estratégia de modelar as camadas corticais em desenvolvimento. A incidência de morte em neurônios pós-migratórios pode variar de 10% até 60% (MILLER, 1995; 2006). Neurônios nas camadas mais superficiais e camadas mais profundas do córtex são mais passíveis de morte do que àqueles localizados nas porções mais internas do córtex. Além disso, neurônios de circuito local numa determinada camada, são duas vezes mais propensos à morte em relação aos neurônios de projeção (MILLER, 2006). Segundo o autor, neurônios supranumerários são gerados para formar andaimes transitórios para o córtex em desenvolvimento e são subsequente eliminados assim que o córtex amadurece (MILLER, 2006). Durante o desenvolvimento do telencéfalo em mamíferos, a gênese de neurônios destinados às seis camadas do córtex cerebral é

precedida pela geração de uma população de neurônios que residem na subplaca (primórdio da substância branca) e a zona marginal (primórdio da camada I) (MILLER, 2006). Esses neurônios estão presentes em grande número durante o desenvolvimento e estabelecimento dos primeiros circuitos sinápticos (CHUN & SHATZ, 1989). Assim que o cérebro sofre maturação, as células desaparecem através de morte neuronal concomitante à invasão de projeções axonais na placa cortical, com a eliminação de sinapses transitórias na subplaca. As observações sugerem que, durante o desenvolvimento, a subplaca é um neuro-eixo sináptico transitório (CHUN *et al.*, 1987) e serve como um posto de orientação para axônios talamocorticais subseqüentemente eliminados por morte celular. Esta idéia de esculpir o córtex através de uma superprodução inicial de neurônios com eliminação reforça o conceito da teoria neurotrófica (LEVI-MONTALCINI, 1987; OPPENHEIM, 1991).

A quantidade total de DNA nos córtices de ratos alcoolizados é 29% menor do que nos controles (MILLER, 1996a), indicando que a microcefalia geralmente está relacionada à redução de proteínas e núcleos totais. A quantidade de morte neuronal causada por exposição durante o período de neurogênese (E11 - E21 em ratos) é similar àquela causada por exposição no início da sinaptogênese (entre P4 e P10) (MILLER, 1988; MILLER & POTEMPA, 1990). Exposição pré-natal ao etanol causa 33% de diferença no número de neurônios no córtex somestésico (MILLER & POTEMPA, 1990). Miller comenta que etanol após os períodos em que ocorrem morte neuronal natural e sinaptogênese não afeta o número de neurônios corticais (MILLER, 2006). O curso temporal da morte celular em córtices de camundongo também varia ao longo do desenvolvimento e está relacionado à progressão do ciclo celular (BLASCHKE *et al.*, 1996, 1998; THOMAIDOU *et al.*, 1997). A maioria da

morte celular programada é observada entre os dias gestacionais E12 e E18 em ratos, quando 25% a 70% das células no córtex cerebral morrem (BLASCHKE *et al.*, 1996). O pico de incidência da morte celular ocorre em E14. Antes de E10 e no adulto, menos de 1% das células corticais estão morrendo. Este padrão mostra que há uma quantidade substancial de morte celular dentro das populações de progenitores neuronais proliferantes. Durante a fase de proliferação, os neuroblastos podem entrar em morte celular programada como parte de um processo natural e comum do cérebro em desenvolvimento embrionário (WEINER & CHUN, 1996; BLASCHKE *et al.*, 1996; 1998). Estes autores observaram que células localizadas na zona ventricular podem ser, experimentalmente, marcadas com BrdU (um marcador de células proliferantes) concomitante a um marcador de célula em processo de morte programada. Isto sugere que é possível ocorrer síntese de DNA para divisão celular e subsequente ativação de programa apoptótico (BLASCHKE *et al.*, 1998). dupla marcação de precursores de neurônios na morte dos precursores neuronais.

Outros estudos, entretanto, descrevem que a maioria das células em processo de morte celular não é marcada com BrdU (MILLER & NOWAKOWSKI, 1988), sugerindo que a mitose deve preceder e disparar o início da morte celular programada em determinadas áreas proliferativas.

Sugere-se que a população de neurônios pós-mitóticos, também, seja sensível à morte celular programada através da inibição da síntese de proteína. A síntese de proteínas anti-apoptóticas, por exemplo, é importante para a regulação nas fases de migração e diferenciação neuronais (REHEN *et al.*, 1999). A deficiência de uma dessas proteínas pode exibir morte maciça de neurônios imaturos no córtex cerebral de camundongos (MOTOYAMA *et al.*, 1995).

Caviness descreve que no cérebro fetal ocorre um pico de morte celular coincidente com o período de maior atividade neurogênica do córtex cerebral (CAVINESS, 1982). Entretanto, este autor considera que não há apoptose em fases precoces da neurogênese (CAVINESS *et al.*, 1995). Grande parte dos estudos que relacionam alcoolismo fetal à morte celular indica índices mais elevados nos períodos de sinaptogênese, quando os neurônios em diferenciação estão emitindo seus axônios e formando conexões com outros neurônios pós-mitóticos (MILLER, 1995; 2006).

Os fatores neurotróficos também assumem um papel importante nos mecanismos de morte celular programada. Postula-se que a sobrevivência neuronal depende da competição por quantidades limitadas de fatores tróficos liberado por alvos. A função de NGF (do inglês, *nerve growth factor*) neste processo deu origem à chamada teoria neurotrófica (EASTER *et a.*, 1985; OPPENHEIM, 1991). Em geral, NGF ativa trkA, BDNF e NT-4/5 são ligantes para trkB, e NT-3 ativa trkC, entretanto há interação cruzada desta seqüência (KOLB *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2003, MILLER, 2006). A ativação de receptores trk inicia as cascatas que produzem efeito sobre a sobrevivência neuronal e, a ligação com P75 pode tanto promover apoptose como a sobrevivência de neurônios (LIESI, 1997; DECHANT & BARDE, 2002; HEMPSTEAD, 2002).

1.7. ETANOL E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO

Atualmente, sabe-se que tanto os receptores de glutamato como os receptores de GABA podem sinalizar eventos tais como a proliferação, migração e diferenciação neuronal, bem como a formação e estabelecimento de sinapses (revisões de VARJU *et al.*, 2001a e LUJAN *et al.*, 2005). Tanto os sistemas

excitatórios como os inibitórios são afetados pelo etanol. Para o segundo, o receptor GABA_A é o mais afetado, sendo um dos alvos em modelos de alcoolismo (PODKLETNOVA *et al.*, 2000; HANCHAR *et al.*, 2005). Uma característica particular do etanol sobre o SNC é o seu efeito tóxico seletivo em estruturas corticais e/ou tipos neuronais específicos (MOONEY & MILLER, 2001; SARI *et al.*, 2004). No pós-nato, o álcool aumenta a inibição GABAérgica de células granulares do cerebelo, colaborando para a compreensão da falta de coordenação motora observada em indivíduos alcoolizados (CARTA *et al.*, 2004). Outro trabalho que sugere envolvimento do sistema GABAérgico no alcoolismo foi demonstrado em porcos da índia submetidos cronicamente ao álcool durante o desenvolvimento o qual apresentava diminuição de neurônios GAD+ nas camadas II/III do córtex somestésico no pós-nato. Isto sugere ou perda de células GABAérgicas, ou falha na expressão da GAD durante o desenvolvimento (BAILEY *et al.*, 2004).

No alcoolismo crônico, os interneurônios inibitórios e receptores pós-sinápticos tornam-se menos responsáveis ao receptor de GABA e, em algumas regiões, pode haver aumento de espinhas dendríticas apicais como possível crescimento compensatório de neurônios não danificados (RUTLEDGE *et al.*, 1986). Os estudos de Bailey e colaboradores (2004) confirmam um aumento na expressão do receptor GABA_A e menor alteração do receptor GABA_B no alcoolismo. Foi descrito que o bloqueio de receptores durante o desenvolvimento pode causar o acúmulo das células que migram tangencialmente (precursores GABAérgicos) nas zonas ventricular e subventricular e, este efeito é acompanhado por menor número destas células na zona marginal, placa cortical e camadas profundas da zona intermediária (LÓPEZ-BENDITO *et al.*, 2003).

1.8. ETANOL E MIGRAÇÃO NEURONAL NO DESENVOLVIMENTO

A extensão e a constituição diversa de tipos neurais e não neurais arranjadas em estruturas laminares são as prováveis causas pelas quais o córtex cerebral está intimamente relacionado a desordens de migração neuronal, levando a lisencefalia, heterotopias acompanhadas de distúrbios de cognição e/ou retardo mental, bem como as epilepsias (ANDERMANN, 2000; PILZ *et al.*, 2002). As heterotopias podem ser localizadas dentro da substância cinzenta (ANTON *et al.*, 1999), na substância branca (KATO & DOBYNS, 2003) ou ainda encontradas fora dos limites de laminação cortical (EKSIOGLU *et al.*, 1996; TAKEDA *et al.*, 2003).

A administração de álcool causa falha na migração de neurônios imaturos, que leva a uma citoarquitetura neuronal anômala e células ectópicas (MILLER, 1986, 1993). Outros trabalhos afirmam que o etanol reduz a taxa de migração durante todo o desenvolvimento (MILLER, 1993). Como a exposição ao etanol transforma prematuramente a glia radial em astrócitos com degradação prematura da glia radial (MILLER & ROBERTSON, 1993), sugere-se que precursores de neurônios glutamatérgicos não migrariam pelas fibras de glia radial ficando retidos em camadas corticais profundas. 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). Em córtices de embriões E17 a taxa média de migração é 138 $\mu\text{m}/\text{dia}$, enquanto sob influência de etanol é de 82 $\mu\text{m}/\text{dia}$. Tais efeitos são similares tanto *in vivo* como *in vitro* (SIEGENTHALER & MILLER, 2004).

Dados recentes demonstram efeitos específicos do etanol sobre as vias de sinalização envolvidas no defeito de migração neuronal no cerebelo (Miller, 2006). Particularmente, a sinalização de Ca^{2+} e nucleotídeos cíclicos são os alvos centrais

da ação do álcool na migração dessas células. Uma dose aguda de etanol reduz a frequência das elevações transitórias de Ca^{2+} e os níveis de GMPc em neurônios migrantes e aumenta os níveis de AMPc. Várias são as cascatas envolvidas, incluindo CaMKII, calcineurina, PP1, Rho GTPase, MAPK e PI3K. Estes resultados indicam que a migração aberrante de neurônios imaturos no cerebelo, causados por consumo materno de álcool, pode estar relacionado ao controle da atividade dessas vias de segundo-mensageiros. Até mesmo baixos níveis de etanol (<5 mM) podem modular as funções de canais de Ca^{2+} ativados por voltagem e ligantes, ligando-se à porção hidrofóbica das proteínas (WALTER & MESSING, 1999). Como a migração das células granulares do cerebelo é altamente sensível às mudanças dos níveis de Ca^{2+} intracelular e sinalização de Ca^{2+} (KOMURO & RAKIC, 1992, 1993; KUMADA & KOMURO, 2004; KOMURO & KUMADA, 2005), sugere-se que o etanol afete a migração de células granulares por alterar múltiplos componentes dessas vias de sinalização.

Foi demonstrado que uma aplicação de etanol (5 g/Kg em camundongo P10) aumenta os níveis de AMPc e diminui os níveis de GMPc no cerebelo após 1 hora. Este efeito está diretamente relacionado à atividade da adenilato ciclase, então, estimular a sinalização de AMPc amplia os efeitos do etanol, enquanto que inibir a sinalização reduz estes efeitos (KUMADA *et al.*, 2006). Porque o etanol aumenta os níveis de AMPc, ele pode lentificar a migração das células granulares por estimular as vias de sinalização de AMPc. O etanol também lentifica a migração por reduzir a atividade das vias de sinalização de GMPc. Isto pode ocorrer quando o etanol altera a amplitude e duração de sinais de nucleotídeo cíclicos por modificar a atividade de uma família específica de fosfodiesterases.

Pesquisas recentes mostram que embora 2,5 mM de etanol não altere a taxa de movimento das células, 10 mM (equivalente a <50 mg/dl) diminui significativamente esta taxa em células granulares do cerebelo, com índices região-específicos (KUMADA *et al.*, 2007). Não se sabe, entretanto, se o etanol poderia ativar vias de sinalização semelhantemente para estruturas anatômicas superiores, tais como as vesículas telencefálicas em estágios do desenvolvimento embrionário.

É provável que estes mecanismos não sejam prevalentes a todas as estruturas do sistema nervoso central.

1.9. ETANOL E FATORES TRÓFICOS / SUBSTRATO DE MIGRAÇÃO

Sabendo-se que inúmeros fatores tróficos são importantes na formação do cérebro, revisamos os principais trabalhos que relacionaram fatores tróficos e substrato de migração no alcoolismo durante o desenvolvimento. Observamos na literatura, que o aumento da atividade do receptor NMDA primariamente causado por altos níveis de BDNF pôde ser bloqueado pelo etanol (KOLB *et al.*, 2005). 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 pode ser observada no córtex pré-natal exposto ao etanol (CLIMENT *et al.*, 2002). BDNF pode modular a organização espacial tanto de células Cajal-Retzius (produtoras de relina) como de neurônios GABAérgicos corticais (ALCÂNTARA *et al.*, 2006). Os autores sugerem a modulação de BDNF na distribuição das células GABAérgicas, devido a desorganização de células GAD+ num modelo de polimicrogiria. Entretanto, nenhum mecanismo ou cascata de sinalização foi descrito neste trabalho para suportar a hipótese.

As culturas de neurônios fetais expostos ao álcool afeta a expressão de *neg*, um gene que parece estar envolvido em neuroproteção mediado por NGF (MILLER *et al.*, 2003). Outros estudos sugerem que o etanol promove a transformação precoce de glia radial em astrócitos via alteração do sistema TGF β , podendo assim, influenciar a proliferação, reduzir a migração neuronal (MILLER & ROBERTSON, 1993) e aumentar a expressão de proteínas de adesão (SIEGENTHALER & MILLER, 2004). Também pode ocorrer estabelecimento de neurônios em camadas corticais inadequadas (MILLER, 1986, 1987).

Além dos fatores tróficos, a formação das heterotopias pode estar relacionada às alterações de componentes da matriz extracelular na superfície pial. A deleção ou disfunção das proteínas na membrana pial como laminina (HALFTER *et al.*, 2002), perlecan (COSTELL *et al.*, 1999) e proteoglicanos de condroitim sulfato (BLACKSHEAR *et al.*, 1997) provocam uma migração excessiva de neurônios em direção à superfície pial e formação de ectopias que se assemelham às heterotopias induzidas pelo etanol. Outro fator que predispõe a formação de heterotopias é a ausência dos sinais de parada pela relina. Acredita-se que a relina atue como um sinal de parada dos neurônios no período final de migração, induzindo o seu descolamento nas fibras de glia radial (PEARLMAN & SHEPPARD, 1996; MARÍN-PADILLA, 1998; DULABON *et al.*, 2000; HACK *et al.*, 2002). Estudos imunohistoquímicos demonstraram que a relina está distribuída de maneira anômala nas heterotopias induzidas pelo etanol (MOONEY *et al.*, 2004).

Existem fortes evidências de comprometimento da laminina pelo etanol (LIESI, 1997; OZER *et al.*, 2000; BEARER, 2001). Esta proteína da MEC está envolvida na migração neuronal e orientação de axônios e, poderia dificultar a migração dependente deste substrato (revisto por MARÍN & RUBENSTEIN, 2003). O

etanol torna fraca a expressão de MBP (*myelin basic protein*), leva ao aumento da degradação da laminina (LIESI, 1997) e inibe o crescimento de neuritos mediado por L1 (uma imunoglobulina que serve para adesão, extensão de neuritos, migração neuronal e fasciculação de axônio) no cerebelo (OZER *et al.*, 2000; BEARER, 2001). A expressão de N-CAM, também pode estar envolvida na inibição de migração neuronal comumente observada (HIRAI *et al.*, 1999). Podemos citar as neurotrofinas, relina e Slit como fatores extrínsecos às células (ZHU *et al.*, 1999; WHICHTERLE *et al.*, 2003) e, as proteínas de citoesqueleto, tais como a filamina, doublecortina e PAFAH1b como intrínsecos dos neurônios. Estes provavelmente interagem com receptores de superfície celular e com vias de sinalização específicos.

Portanto, muitos fatores podem intensificar ou até mesmo promover defeitos na formação do encéfalo embrionário exposto ao álcool durante a gestação.

1.10. O MODELO PROPOSTO

A grande maioria dos estudos envolvendo o alcoolismo na gestação e SAF investigaram os efeitos do etanol em modelos e estruturas neurais em períodos pós-natais. Pouca atenção têm sido dada aos efeitos do etanol no cérebro durante a sua formação e, muito menos se sabe sobre seu impacto na formação do sistema GABAérgico. Além disso todos os modelos utilizam administração crônica de etanol, o que dificulta pontuar sua ação no desenvolvimento de determinada estrutura e ou sistema.

A função do GABA no encéfalo embrionário é intrigante e levanta vários questionamentos. Curiosamente, casos de epilepsia também estão associados à síndrome fetal alcoólica (ACHESON *et al.*, 1999), podendo indicar um possível

desbalanço da atividade excitatória-inibitória em estruturas telencefálicas. Há estudos em epilepsia e epileptogênese demonstrando ineficiência do sistema GABAérgico neocortical (SILVA *et al.*, 2002).

Um número crescente de investigações também têm centrado esforços nos defeitos de migração neuronal em modelos de alcoolismo fetal. Entretanto, grande parte desses estudos descrevem os mecanismos em estruturas que se formam tardiamente no desenvolvimento, como é o caso do cerebelo e hipocampo.

Nossa proposta foi investigar alguns dos possíveis efeitos do álcool durante a fase inicial da formação do sistema GABAérgico telencefálico, já que muitos trabalhos sugerem que interneurônios GABAérgicos são mais propensos a neurotoxicidade do álcool em relação aos neurônios de projeção glutamatérgicos.

O estágio do desenvolvimento dos embriões e administração de álcool utilizados corresponde ao início do pico de migração tangencial dos precursores GABAérgicos, provenientes do telencéfalo ventral. Desta forma, foi possível avaliar a expressão de componentes relacionados ao sistema GABAérgico, tanto nas zonas germinativas como nas estruturas alvo (telencéfalo dorsal).

Não há qualquer relato sobre os efeitos do álcool no modelo proposto, especificamente, os efeitos do etanol administrado durante o início da formação do sistema GABAérgico telencefálico.

2. OBJETIVO

Verificar os efeitos do álcool na formação do sistema GABAérgicos telencefálico em camundongos durante o início do período de migração tangencial dos precursores GABAérgicos.

Objetivos específicos:

- 1) Verificar se há perda específica de interneurônios GABAérgicos no telencéfalo.
- 2) Verificar se há alteração da migração tangencial e aumento de morte celular.
- 3) Verificar e quantificar, através de *western blot*, a expressão da enzima de síntese do GABA (GAD 65/67) nas zonas progenitoras e estruturas alvo (primórdio do córtex cerebral dorsal) das células migrantes.
- 4) Verificar possíveis alterações comportamentais, atividade locomotora espontânea, após administração pré-natal de etanol, em camundongo pós-natal.
- 5) Verificar se o modelo (dose e modo de administração alcoólica) testado foi adequado para estudos de alcoolismo fetal na formação do sistema GABAérgico telencefálico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E PROCEDIMENTOS

Todos os procedimentos com animais estão de acordo com as recomendações do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ. Todos os esforços foram realizados de modo a minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

Utilizamos camundongos (fêmeas) Suíças mantidas no Biotério do Departamento de Anatomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todos os animais foram mantidos em caixas contendo ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada entre 23 e 25°C e fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro). Para a obtenção de embriões, os animais foram acasalados num período de 12 horas e o tampão vaginal inspecionado na manhã seguinte ao acasalamento para detecção do tampão. O peso corporal foi verificado periodicamente para confirmação e progressão da gestação.

Denominou-se E1 o dia da concepção, que tem início na primeira metade do dia do acasalamento e, P1 o dia do nascimento.

Dois grupos foram formados para o experimento: grupo tratado com etanol (ETOH) e grupo controle (CON). No décimo quarto dia embrionário (E14) as fêmeas grávidas ETOH e CON foram previamente anestesiadas com vapor de éter e os embriões retirados através de incisões cesáreas. As fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical logo após a retirada dos embriões. Imediatamente após a cesárea, os encéfalos embrionários foram removidos do crânio em placa de Petri contendo salina tamponada com fosfato (PBS) (0,1M, pH 7,4) gelado. As eminências ganglionares medial (MGE), lateral (EGL) e o córtex (CTX) foram dissecados sob

auxílio de microscópio e instrumentos cirúrgicos. Toda a ninhada de camundongos grávidas controle (n=3) e alcoolizadas (n=3) foram utilizadas para obtenção de tecido embrionário, para *western blot*, como descrito a seguir.

Durante a cesárea, outros encéfalos inteiros dos grupos ETOH (n=10) e CON (n=10) foram destinados à técnica imuno-histoquímica. Estes encéfalos foram processados junto ao tecido não neural circunjacente para evitar perda de estruturas neurais nos cortes em criostato.

3.2. TRATAMENTO

Utilizamos para o presente trabalho, etanol (VETEC, apresentando 99,8% de pureza e 0,2% de H₂O, sem traços de metanol). Um primeiro grupo de fêmeas grávidas foi submetido a testes pilotos de vias de administração intraperitoneal (i.p.) e por gavagem intragástrica (v.o.) de etanol em duas concentrações alcoólicas durante 4 aplicações diárias consecutivas. As doses testadas foram de 2 g/Kg (v.o.) e 3,5 g/kg (i.p.) diluídas em PBS a 50%. O grupo CON recebeu apenas o veículo. Esse tratamento ocorreu entre o décimo primeiro e décimo quarto dias embrionários (E11 - E14), entre 9:00h e 10:00h da manhã por contenção manual rápida sem a utilização de anestésicos. O período (E11 - E14) de administração alcoólica compreende o início do período de migração tangencial dos precursores GABAérgicos para o córtex cerebral. A via de administração intragástrica na dose 2,0 g/Kg foi eleita como o protocolo mais adequado.

3.3. DOSAGEM PLASMÁTICA DE ETANOL

A dosagem de álcool no sangue foi realizada utilizando o kit *Alcohol Reagent Set (Point Scientific)*. Este é um método indireto de quantificação de etanol pela

atividade da álcool desidrogenase. O sangue de três fêmeas grávidas alcoolizadas e uma não alcoolizada foi coletado através de punção venosa na cauda, heparinizado e centrifugado a baixas temperaturas para coleta de plasma sanguíneo. A coleta se deu nos tempos 10, 30 e 45 minutos e, 1, 1,5, 2 e 3 horas após a administração de etanol por gavagem. Os reagentes do kit foram diluídos em água ultrapura obtida por bidestilação e a reação de incubação do plasma ocorreu em “banho-maria” a 37°C por 5 minutos. Logo após, os valores da atividade enzimática foram obtidos em leitor de ELISA lido no comprimento de 540 nm. Um gráfico dos valores médios da curva de concentrações de álcool no plasma sanguíneo foi construído em função do tempo.

3.4. WESTERN BLOT

Após a fase experimental de administração do álcool, 3 ninhadas de cada grupo forneceram os encéfalos embrionários E14 para dissecação da EGM, EGL e CTX e homogeneização dos tecidos em tampão contendo inibidores de proteases. Quantificamos as amostras pelo método de BCA, seguindo o protocolo do fabricante e, 20µg de proteína de cada amostra foram separados em gel de poliacrilamida a 9% em corrente elétrica a 120 V em tampão de corrida. As amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham) a 10 V por 40 min.

A membrana foi bloqueada por 2 horas em tampão Tris salina (TTBS) com 5% de leite desnatado e 1% de albumina de soro bovino (BSA) em temperatura ambiente sob agitação e, em seguida lavada 3 vezes por 10 minutos com TTBS. Terminada esta etapa, realizamos a incubação da membrana com os anticorpos primários (anti-GAD65/67 de ovelha, diluído 1:10.000 e anti-β actina de coelho 1:5000) diluídos em TTBS e BSA 1% durante 12 horas, sob leve agitação a 4°C. No

dia seguinte, a mesma foi lavada 3 vezes por 10 minutos em TTBS e, em seguida, iniciada a incubação com os anticorpos secundários conjugados a HRP (Vector, anti-ovelha 1:10.000 e anti-coelho, 1:10.000) por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Novamente a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos em TTBS, incubada com ECL Plus (Amersham) por 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação e revelada em filme fotográfico (*Hyperfilm*) expostos por 5 min e ao revelador (KodaK), manuseado ao abrigo de luz em câmara escura com luz ultravioleta (UV).

Os filmes foram escaneados e submetidos a densitometria e análise utilizando o programa *Scion Image* (versão 5.0). O gráfico obtido das 3 amostras foram feitos através do software *Prisma* (versão 3.1), bem como a estatística. Os valores densitométricos foram colocados em gráfico em valores arbitrários ajustados à densitometria do controle de carregamento com β actina em cada corrida de cada gel.

3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram obtidos 10 encéfalos E14 de 5 gestações de cada grupo, destinados à reação imuno-histoquímica. Então, estes foram fixados em solução de paraformaldeído (PFA) tamponada a 4% e glutaraldeído 1%, durante 4h. Em seguida os encéfalos passaram por soluções de sacarose 10, 20 e 30%, respectivamente. Os encéfalos foram emblocados em TMF (*Tissue Medium Freezing*), congelados em nitrogênio líquido e cortados coronalmente (7 a 9 μ m de espessura) em criostato a -20°C . Estes cortes foram coletados em lâminas previamente tratadas com gelatina 2,5% + poli-L-lisina 1%. As lâminas foram estocadas em freezer a -70°C até o início da reação.

Os cortes histológicos coronais foram incubados por 10 minutos com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS em pH 7,4 para bloqueio de catalase endógena, depois lavados 2 vezes por 5 minutos com tampão PBS pH 7,4 (PBS) contendo Triton X-100 (Reagen) a 0,25% e então, incubados com solução contendo soro normal de cabra a 10% com o objetivo de bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS, três vezes de 5 minutos e cada lâmina incubada, separadamente, em anticorpos primários (anti-GABA de coelho, Sigma, 1:5.000 e anti-calretinina de coelho, Chemicon 1:2000) por 12 horas. Devido a diferenças da expressão de GABA em cada experimento, todos os encéfalos alcoolizados foram pareados com encéfalos controles de animais tratados nos mesmos dias e horários, até a coleta dos cortes histológicos em mesma lâmina para subsequente processamento nas mesmas condições de reação imuno-histoquímica. No dia seguinte, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com anticorpos secundários biotinizados (Vector, anti-coelho 1:200) por 1,5 h. Em seguida, lavamos 3 vezes de 10 min e incubamos com complexo avidina-biotina (Vector) por 1h conforme especificações do fabricante e, em seguida, com o cromógeno para reação de peroxidase (SK-4700, Vector) por até 10 min. Lâminas de controle foram processadas sem o anticorpo primário, seguindo-se o mesmo protocolo. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan acoplado a um computador via sistema de vídeo-câmera Zeiss (programa *Axio Vision* LE). As imuno-histoquímicas foram quantificadas utilizando uma ocular de 10 X no microscópio com graticulas graduadas. O córtex parietal dos encéfalos na idade pós-natal P180 foi analisado e quantificado o número de células GABA positivas em dois campos aleatórios, em 3 animais de cada grupo. Estes campos incluíram todas as camadas corticais (I-VI). As imagens foram armazenadas em CD-

R e as figuras montadas utilizando o programa *Photoshop* (versão 7.0). Somente as lâminas processadas cujo controle negativo não apresentaram marcações inespecíficas e boa marcação do anticorpo primário foram analisadas e apresentadas como resultados.

3.6. DETECÇÃO DE MORTE CELULAR (TUNEL)

Para a detecção de morte celular programada utilizamos a técnica de TUNEL, que marca núcleos com fragmentação de DNA e a marcação da cromatina com o intercalante de DNA fluorescente, DAPI, que permite a identificação indistinta de todos os núcleos.

Foram utilizados dois Kits para detecção de fragmentação de DNA *in situ*. (TUNEL *Apoptose Detection Kit – DNA Fragmentation/Fluorescence staining*; Lot. 1350578, *Upstate cell signaling solution*). Os cortes foram incubados em Triton X-100 a 0,5% por 15 minutos, ao invés da proteinase K, que foi muito agressivo e digeriu o tecido embrionário E14. Depois, eram lavados por 10 minutos em PBS pH 7,4, incubados com tampão transferase deoxiuridil terminal 1 X (TdTBuffer), por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de incubação com a enzima terminal desoxinucleotidil transferase (TdT) e o tampão de reação por 1h, a 37°C em câmara úmida. A reação foi interrompida com a incubação em tampão de parada do fabricante (*Stop Solution 1X*) por 2 vezes de 5 min à temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS, por 10 minutos. Então, foi feita incubação com anti-digoxigenina conjugado a fluoresceína (FITC) por 1 h, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS por 10 minutos. Em seguida foi feita a incubação com a solução do intercalante de DNA, DAPI, por 2 minutos. Após a lavagem em PBS as lâminas foram montadas com N-Propil-Galato (diluído em glicerina a 5%) e a

quantificação feita nos dois dias subseqüentes à reação. Para quantificação contamos o número total de núcleos TUNEL positivos na eminência ganglionar lateral (EGL), eminência ganglionar medial (EGM), primórdios do córtex (CTX) e do hipocampo (PH) em cortes coincidentes em ambos os grupos (CON e ETOH). Através do programa *AxioVision* circundamos cada uma das estruturas mencionadas acima e calculamos a densidade de núcleos corados por área para cada corte analisado.

3.7. TESTE DE COMPORTAMENTO (CAMPO ABERTO)

Camundongos de cada grupo (n=12) foram mantidos no biotério, providos de ração e água *ad libitum*, sem qualquer exposição ao etanol até o nascimento e período pós-natal (P40 e P180). Analisamos 4 animais de cada grupo (CON, n=4 e ETOH, n=4) em P40, os quais foram alcoolizados a 3,5 g/Kg i.p. Estes foram, então, avaliados pelo teste de campo aberto (*open field*). O mesmo aconteceu para os camundongos na idade P180 alcoolizados a dose de 2,0 g/Kg (CON, n=8 e ETOH, n=8). Para isto os animais foram monitorados numa caixa de madeira medindo 60x60x60cm. Na base desta caixa foram delineados 64 quadrados com fita adesiva preta. Utilizamos uma câmera filmadora acoplada a um tripé de alumínio e fitas de vídeo (Sony, 120min - 8mm). Todo o experimento foi filmado para que posteriormente os seguintes parâmetros fossem quantificados: (1) número de quadrados periféricos e centrais percorridos, (2) número de vezes que os camundongos levantam as patas dianteiras (*rearing*), (3) número de vezes que limpavam as vibrissas (*grooming*), (4) tempo decorrido para alcançar o centro da arena, (5) número de quadrados percorridos no centro da arena, e (6) a quantidade de fezes depositadas na arena durante o teste. O comportamento dos animais

ETOH e CON foi filmado durante 5 min entre as 17:00 e 18:00 horas, durante 4 dias consecutivos. O teste teve como objetivo, avaliar e comparar a atividade exploratória e locomotora espontânea dos camundongos controle (CON) e alcoolizado (ETOH).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos grupos ETOH e CON foram analisados e os testes estatísticos realizados através dos programas Prisma (versão 3.0), e Biostat (versão 3.1). Os valores obtidos foram comparados através do teste T e ANOVA, e *Kruskal-Wallis* com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. PROTOCOLO ETANOL

Realizamos 4 aplicações diárias consecutivas de etanol nas doses 2,0 g/Kg (v.o.) e 3,5g/Kg (i.p.) nos dias embrionários E11 a E14. Este período corresponde à fase inicial da migração tangencial em camundongos. Testamos a administração de álcool tanto por via intraperitoneal como por gavagem intragástrica e observamos que a primeira causava um efeito sedativo visivelmente mais pronunciado quando comparado à gavagem. A administração de etanol a 3,5 g/Kg por via intraperitoneal foi testada e teve efeito abortivo entre os períodos embrionários E13 e E14. Nestes casos todos os embriões da fêmea grávida eram abortados no mesmo dia com frequência de 33,3% dos animais testados na dose de 3,5g/Kg (n=24).

A administração intragástrica de etanol a 2,0g/Kg produziu efeito sedativo sem prevalência de aborto dos embriões alcoolizados. A sedação foi observada nas fêmeas logo após a gavagem, com duração média de 1 hora. Desta forma, o modelo de 2,0g/Kg de etanol entre os dias embrionários E11 e E14, administrado por gavagem intragástrica refere-se ao modelo mais adequado de doses intoxicantes sem comprometer o nascimento dos embriões. Entretanto, algumas considerações descritas a seguir foram feitas em relação aos efeitos do etanol em doses altas (3,5g/Kg).

4.2. ALCOOLEMIA

Logo após a aplicação de álcool (2 g/Kg), medimos os níveis de etanol plasmático. Observamos que as concentrações plasmáticas atingiram o pico ($127 \pm 2,13\text{mg/dL}$, n=3) 45 minutos após a administração alcoólica. Três horas após a

administração, estes níveis declinaram a zero. A curva de concentração de álcool em função do tempo pode ser observada no Gráfico 1. Observamos que fêmeas nulíparas apresentaram curvas de concentração de álcool com valores de pico mais baixos quando comparado às grávidas no período estudado (E11 - E14). Além disso, o pico atingido por aquelas ocorre 1 hora após a administração de etanol na mesma dose (97,6mg/dL, n=1).

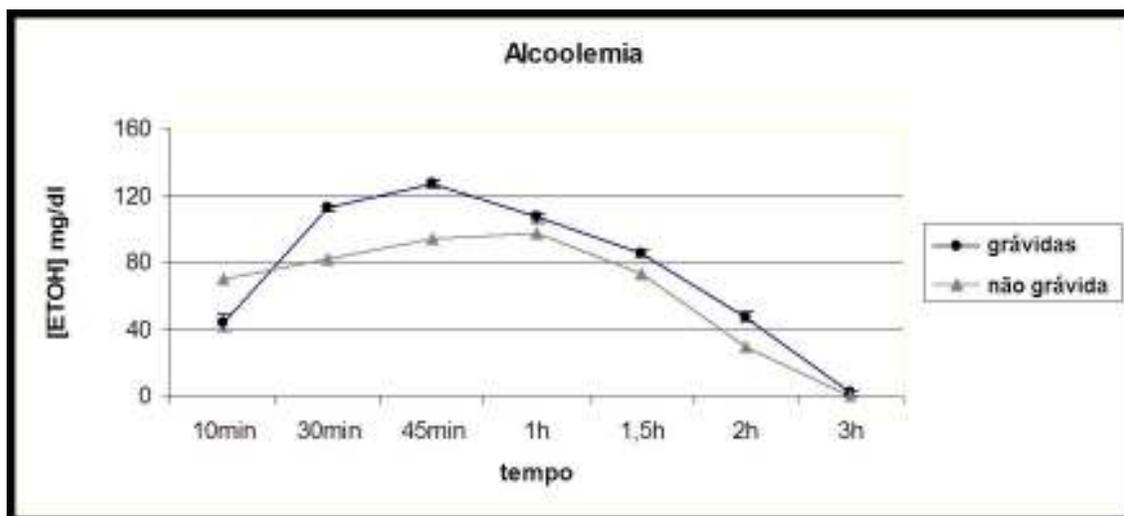


Gráfico 1: Curva de concentrações alcoólicas plasmáticas médias (n=3) em função do tempo, a partir da administração (0 min) de etanol (ETOH) por gavagem em fêmeas grávidas (n=3) e não grávida (n=1) em E13. Observa-se que o pico de concentração alcoólica ocorre 45 min após a gavagem em fêmeas grávidas.

4.3. MACROSCOPIA

O número total médio de embriões em cada gestação não diferiu estatisticamente entre os grupos (CON $8,07 \pm 5,4$ e ETOH $9,7 \pm 4,82$, n=32), nem houve diferenças de gênero (macho e fêmea) do grupo alcoolizado pós-natal comparado ao grupo CON. A dose de 2 g/Kg não propiciou falhas de fechamento do tubo neural, prevalência de holoprosencefalia, microencefalia, alterações do crânio e face ou outras malformações macroscópicas durante o desenvolvimento embrionário. O tamanho e volume das eminências ganglionares também não foram

afetados pelo tratamento com etanol (Figura 7), o que foi confirmado pela extração e quantificação de proteína para *western blot*.

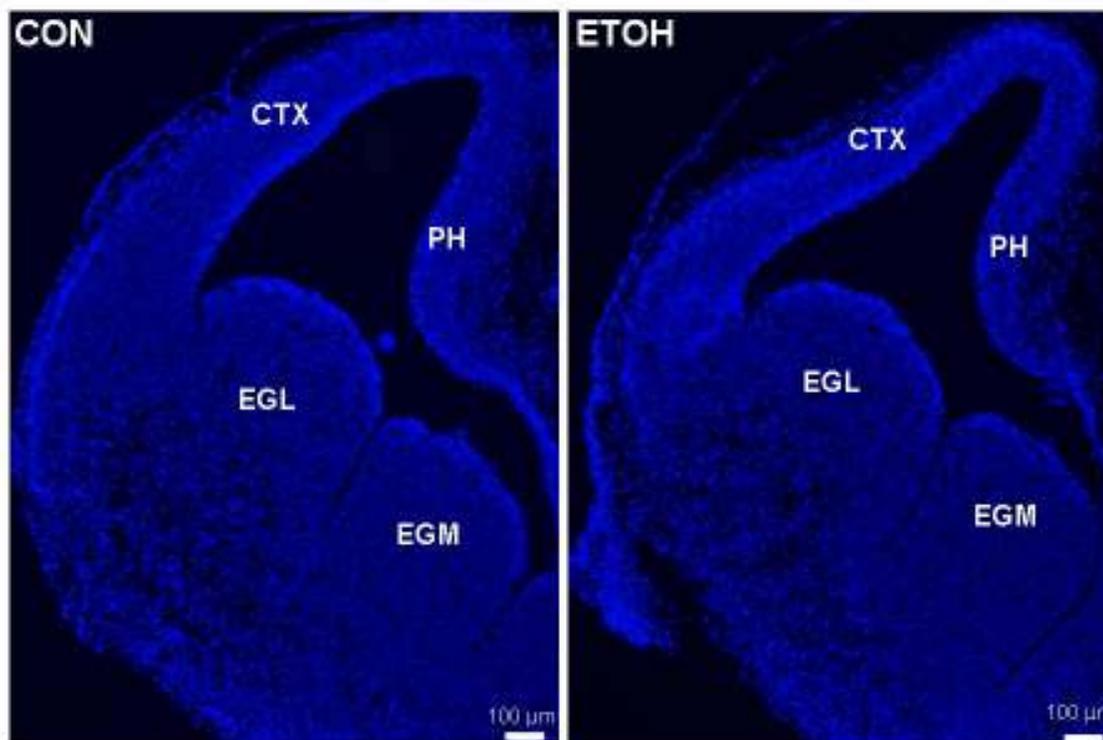


Figura 7: Fotomicrografia de encéfalos embrionários controle (CON) e alcoolizado (ETOH) em corte coronal (9µm) ao nível das eminências ganglionares medial (EGM) e lateral (EGL). Indicados: primórdios do córtex cerebral (CTX) e hipocampo (PH). Coloração com DAPI.

Entretanto, em experimentos-piloto de 3,5g/Kg de etanol houve malformações de membros, redução no tamanho dos embriões, holoprosencefalia e até mesmo aborto em parte dos embriões alcoolizados. Não avaliamos a prevalência e anatomopatologia destes embriões, já que optamos por utilizar doses mais baixas (2 g/Kg ETOH) para o presente trabalho.

Após o tratamento (ETOH 2 g/Kg), no momento da extração dos embriões durante cesárea, observou-se que 4,06% (n=112) dos embriões estavam pouco vascularizados e apresentavam tecido friável à manipulação. Entretanto, estes são, comumente, embriões inviáveis em processo de reabsorção e sua frequência não diferia entre os grupos (CON 4,52±1,56 e ETOH 3,9±1,34, n=112).

A medida de peso úmido dos encéfalos em E14 também não diferiu entre os grupos (CON, $13,8 \pm 3,4\text{mg}$, $n=22$ e ETOH, $13,3 \pm 2,9\text{mg}$, $n=17$; $P>0,05$). As dissecções de encéfalos, visualmente, não indicaram variações de tamanho na EGL, EGM e CTX, o que foi ratificado pela quantificação do extrato protéico nas preparações de *western blot*.

4.4. AVALIAÇÃO DA GAD 65 E 67 NAS EMINÊNCIAS E NO CÓRTEX CEREBRAL

Para verificarmos se o sistema GABAérgico estava alterado, utilizamos um anticorpo que reconhece as duas principais isoformas da enzima de síntese do GABA (GAD65/67). Através dos géis de *western Blot* e densitometria dos mesmos, encontramos aumento significativo na expressão de GAD65/67 na EGL do grupo ETOH. A EGM e CTX, entretanto, não apresentaram diferenças. Estes dados podem ser observados na Figura 8 e no Gráfico 2.

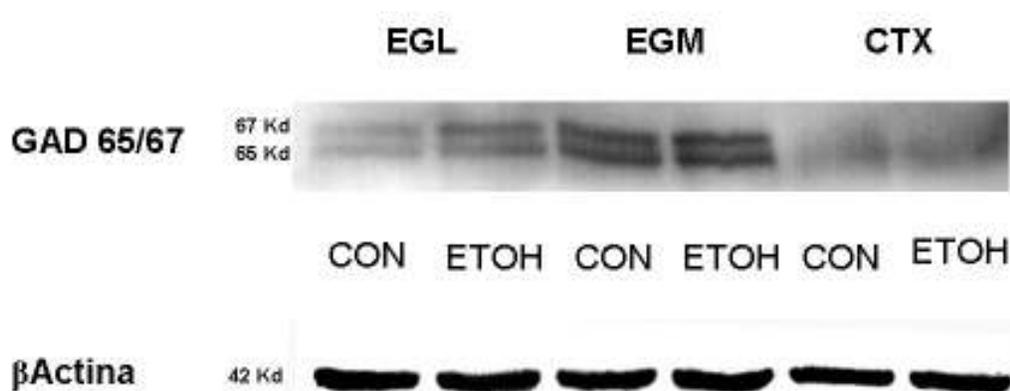


Figura 8: *Western blot* para a proteína GAD65/67 na eminência ganglionar lateral (EGL), eminência ganglionar medial (EGM) e córtex (CTX) de camundongos Suíços embrionários E14. Indicados: grupo controle (CON) e tratado com etanol a 2 g/Kg (ETOH)

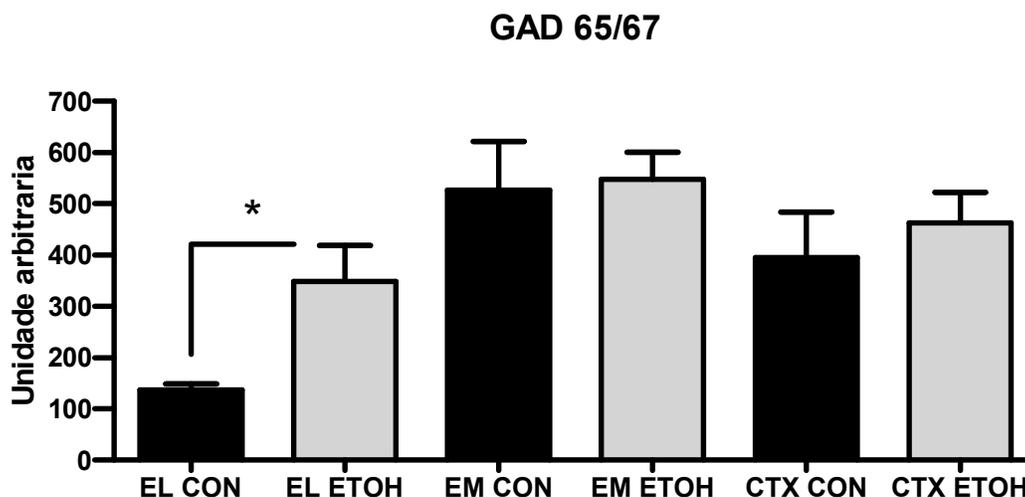


Gráfico 2: Valores arbitrários médio e desvio padrão da densitometria de *western blot* para GAD65/67 (n=3) da EGL, EGM e CTX de encéfalos embrionários E14 controle (CON) e alcoolizado (ETOH). * P= 0,0068. Valores estatisticamente significativos quando P<0,05.

4.5. DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS GABAÉRGICAS NOS ENCÉFALOS

A localização da marcação de GABA nos encéfalos dos dois grupos foram similares entre CON e ETOH, com expressão mais intensa no telencéfalo ventral (Figura 9). Em ambos os grupos, a intensidade de marcação na zona do manto era sempre superior ao das zonas proliferativas. A marcação por GABA se estendia até a área entopeduncular anterior.

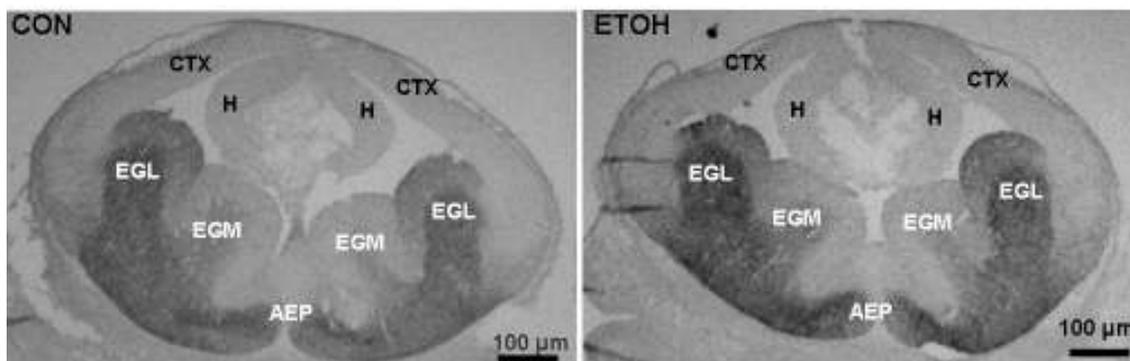


Figura 9: Fotomicrografia de baixo aumento de imuno-histoquímica para GABA em encéfalos embrionários E14 controle (CON) e alcoolizado (ETOH) em corte coronal (9µm) ao nível das eminências ganglionares medial (EGM) e lateral (EGL). Note que nos dois grupos há uma marcação mais intensa na zona do manto das eminências, quando comparado às zonas proliferativas. Indicados: primórdios do córtex cerebral (CTX), hipocampo (H) e área entopeduncular anterior (AEP).

Houve aumento da marcação de GABA na zona do manto da eminência ganglionar lateral (EGL), sem alteração significativa da eminência ganglionar medial (EGM) e primórdio do córtex cerebral (CTX) (Figura 9). Este aumento foi mais visível na EGL do grupo ETOH (Figuras 10 e 12) e é compatível com a quantificação da GAD65/67 através da densitometria nos resultados de *western blot* (Figura 8 e gráfico 2) acima descritos. O aumento de GABA na EGL no tecido do grupo alcoolizado pode ser observado em menor e maior aumento nas Figuras 9, 10 e 12, respectivamente.

O tratamento com etanol não causou obstrução da migração dos precursores GABAérgicos para o ângulo córtico-estriatal (Figura 10) e deste para o primórdio do córtex cerebral (Figura 11).

Como pode se observar, as células imunorreativas para GABA estão dispostas nas rotas migratórias tangenciais e apresentam morfologia de células migrantes (bipolar) direcionadas para o telencéfalo dorsal (Figuras 10 e 11). O córtex de animais alcoolizados em E14 também apresentou células GABAérgicas na zona marginal e na placa cortical (Figura 11).

A marcação densa de GABA no telencéfalo ventral não permitiu quantificar o número de interneurônios devido à contigüidade de um grande número de células GABA positivas justapostas, e à presença de marcação na matriz tecidual (Figuras 12 e 13). O número de células GABAérgicas do CTX no terço proximal ao ângulo córtico-estriatal não diferiu significativamente entre os grupos (CON $119 \pm 30,66/\text{campo}$ e ETOH $123 \pm 27,54/\text{campo}$, $n=12$).

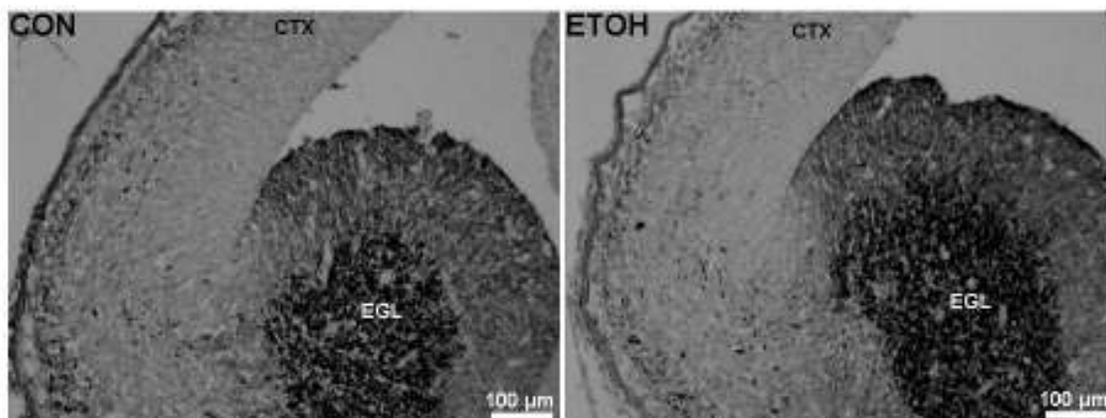


Figura 10: Fotomicrografia de imuno-histoquímica para GABA de encéfalos embrionários E14 controle (CON) e alcoolizado (ETOH) em corte coronal (9µm) ao nível das eminências ganglionares medial e lateral (EGL). Indicado: primórdio do córtex cerebral (CTX). Note o aumento de intensidade de marcação na zona do manto do grupo ETOH, quando comparado ao controle.

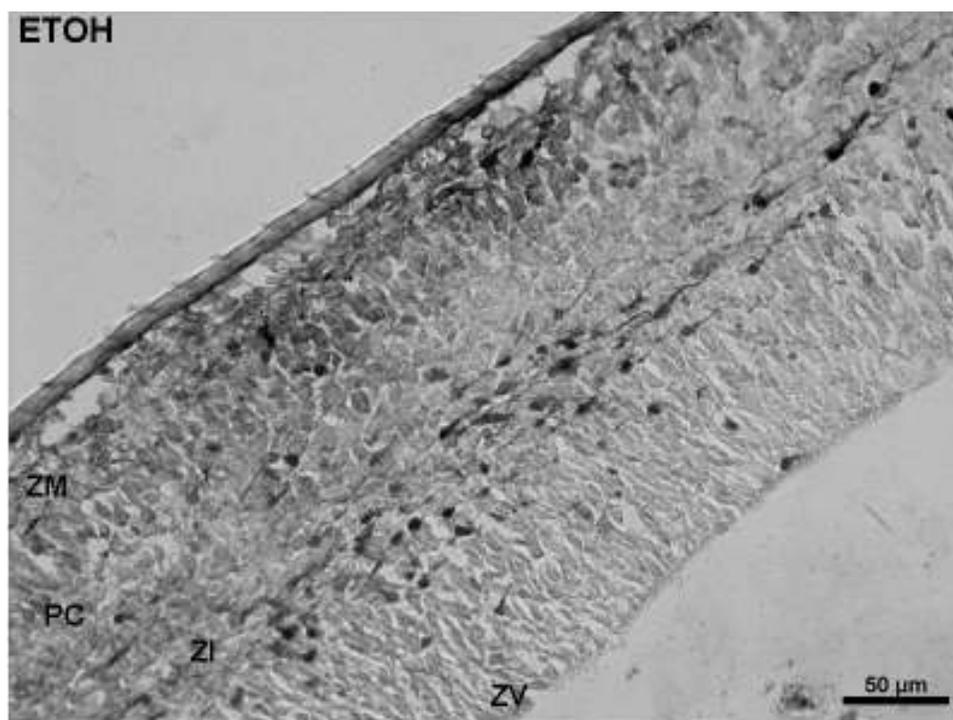


Figura 11: Fotomicrografia de imuno-histoquímica para GABA em encéfalo embrionário E14 alcoolizado (ETOH) em corte coronal (9µm) ao nível do córtex cerebral. É possível observar células individualizadas com morfologia migratória direcionadas tangencialmente ocupando a borda entre a zona intermediária (ZI) e a zona ventricular (ZV). Indicados: Zona marginal (ZM), placa cortical (PC).

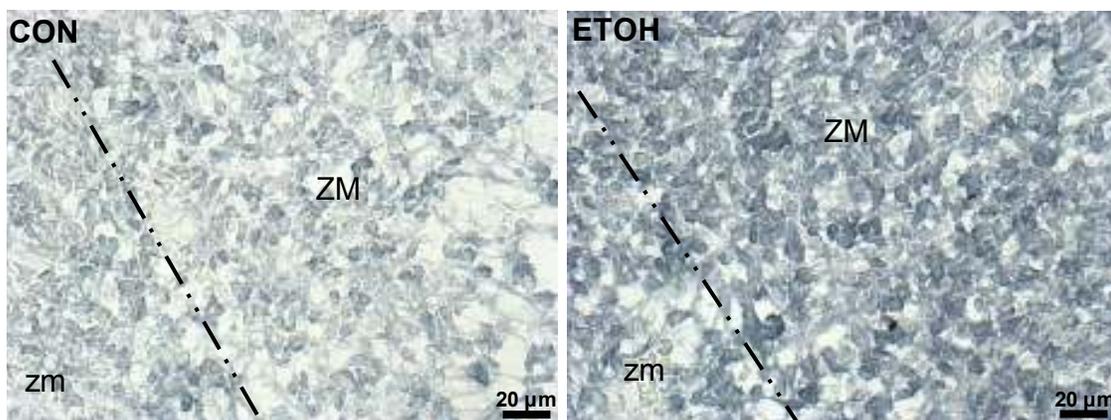


Figura 12: Fotomicrografia em grande aumento de imuno-histoquímica para GABA em encéfalos embrionários controle (CON) e alcoolizado (ETOH) em corte coronal (9µm) ao nível do córtex cerebral. Indicados: zona marginal (zm) e zona do manto (ZM) da eminência ganglionar lateral. A linha tracejada marca o limite entre a zm e ZM.

A imunomarcção de GABA no primórdio do hipocampo também não foi afetada pelo tratamento com etanol a 2 g/Kg (Figura 14).

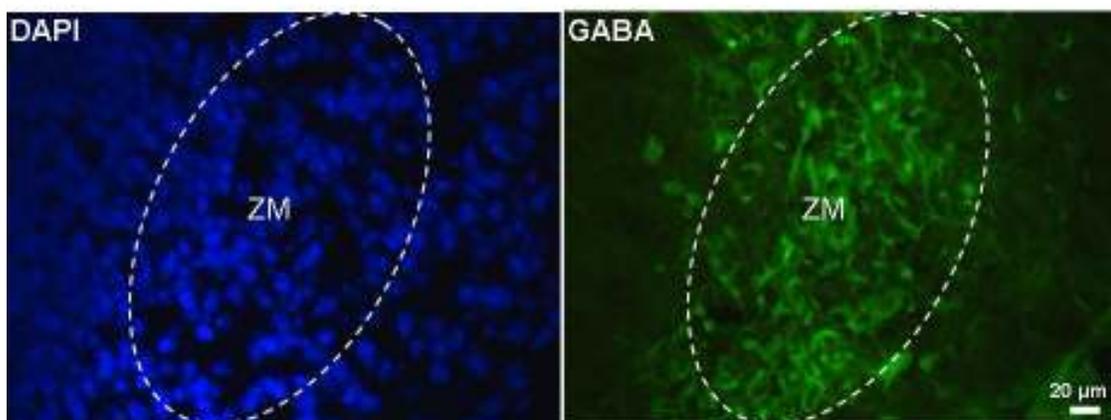


FIGURA 13: Fotomicrografias de corte coronal (9µm) de encéfalo embrionário E14 alcoolizado (ETOH) com imunofluorescência para GABA (verde) em grande aumento mostrando a zona do manto (ZM) da eminência ganglionar lateral (EGL) circunscrita no círculo tracejado. Pode-se observar marcação para GABA em regiões onde não há marcação nuclear (azul) nas áreas correspondentes a marcação de GABA.

Em doses altas de etanol (3,5 g/Kg), entretanto, foi observada uma diminuição de células imunomarcadas para calretinina (proteína ligadora de cálcio que marca uma subpopulação de neurônios GABAérgicos) no grupo ETOH (Figura 15).



Figura 14: Fotomicrografia de imuno-histoquímica para GABA de encéfalos embrionários E14 controle (CON) e alcoolizado (ETOH) em corte coronal (9 μ m) ao nível do hipocampo. Indicados: primórdios do hipocampo (H) e ventrículo lateral (VL).

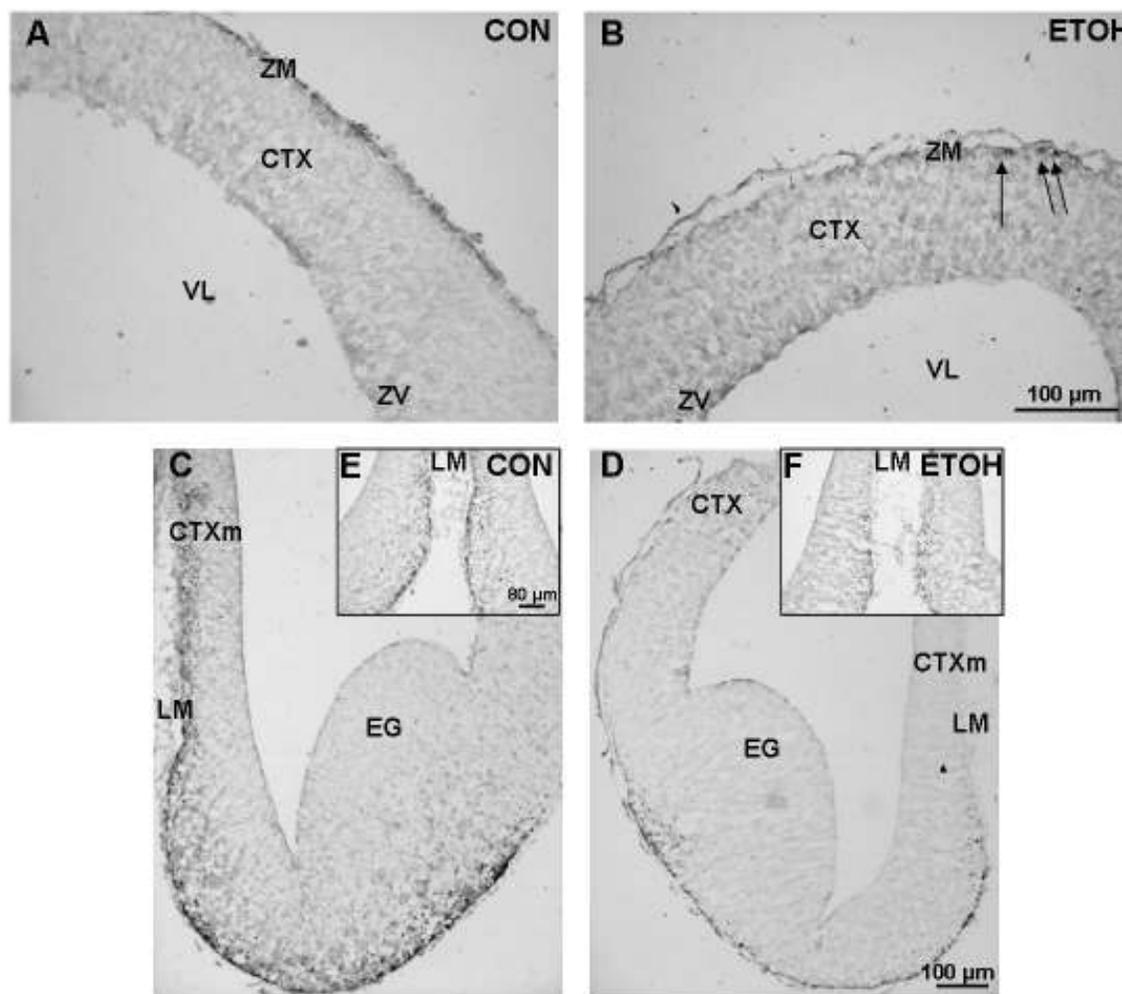


Figura 15: Fotomicrografia de imuno-histoquímica para calretinina em cortes coronais (9 μ m) de encéfalos embrionários E14 de animais dos grupos CON (A, C e E) e ETOH (3,5g/Kg) (B, D e F). Em A, observa-se células marcadas para calretinina ao longo da zona marginal (ZM), mas não nas outras regiões do córtex (CTX). Em B, há marcação não uniforme na ZM do córtex dorso-medial (setas) do grupo ETOH. Em C, nota-se marcação mais expressiva do que em D. A mesma diferença também

pode ser observada na linha média (E e F). Indicados: zona ventricular (ZV), ventrículo lateral (VL), eminência ganglionar (EG), linha média (LM) e córtex medial (CTXm).

Em animais P40 no modelo de alcoolismo a 2,0g/Kg, não foi observado aumento da densidade de células GABA positivas no córtex parietal do grupo ETOH, quando comparado ao controle. Embora a figura indique um aparente aumento dessas células no CTX alcoolizado, na Figura 16, esta diferença não foi observada em todos os animais e lâminas analisadas e os dados não foram estatisticamente significativos (CON, $89,62 \pm 17,4$ células/mm² e ETOH, $101,66 \pm 17,54$ células/mm², n=3).

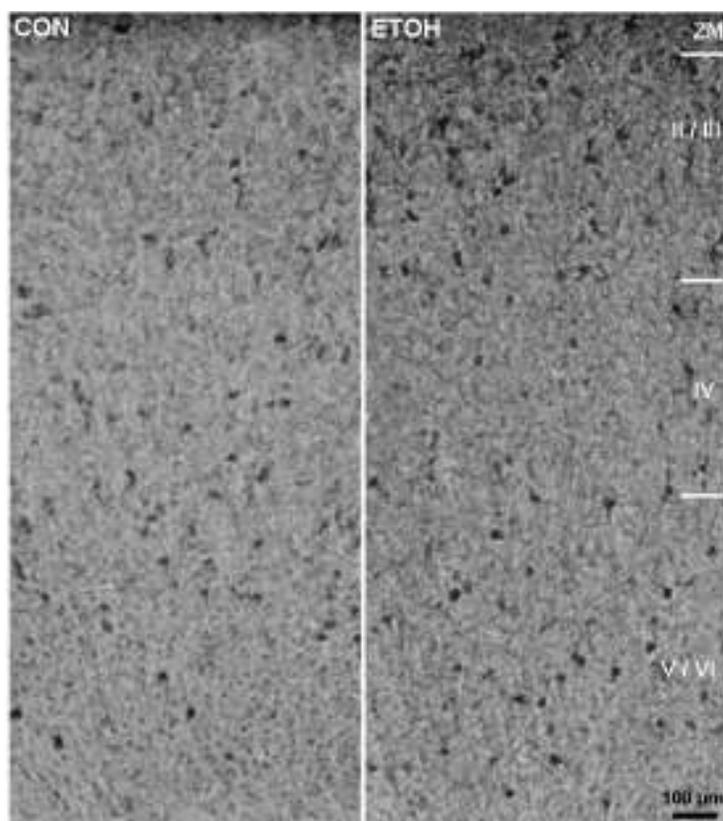


Figura 16: Fotomicrografia de imunohistoquímica para GABA em córtex parietal de camundongos P40 controle (CON) e alcoolizado (ETOH) em corte coronal (12µm) da zona marginal (ZM) e camadas corticais II/III, IV e V/VI. Sugere-se mais neurônios gabaérgicos no córtex parietal do grupo ETOH.

4.6. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR NO CÓRTEX CEREBRAL E EMINÊNCIAS GANGLIONARES

A reação de TUNEL permitiu observar e quantificar núcleos apoptóticos em todas as regiões estudadas, nos grupos ETOH e CON. Os núcleos corados para TUNEL na EGL e CTX foram significativamente aumentados no grupo ETOH. Em relação à área foram estatisticamente aumentados na EGL ($p=0,035$) e CTX ($p=0,016$). Uma tendência ($p > 0,05$) ao aumento de morte celular foi observada no primórdio do hipocampo (HP) e os valores na EGM foram praticamente idênticos entre os grupos ETOH e CON ($p=0,67$). Estes valores estão indicados na Tabela 1.

	EGL	EGM	CTX	HP
CON	1,79 ± 1,81	4,47 ± 1,08	3,69 ± 2,64	7,75 ± 6,58
ETOH	4,33 ± 1,32 *	4,97 ± 2,29	8,25 ± 1,75 *	11,16 ± 4,37

Tabela 1: Valores numéricos médios e desvio padrão da densidade de núcleos apoptóticos/mm² nos grupos controle (CON) e alcoolizado (ETOH), na eminência ganglionar lateral (EGL), eminência ganglionar medial (EGM), primórdios do córtex (CTX) e hipocampo (H) em camundongos na idade E14. Estatisticamente significativo (*) quando $p < 0,05$; $n=12$.

O número absoluto de células mortas nas eminências ganglionares foi compatível com o obtido pela técnica de vermelho neutro realizado por nosso grupo (MENDES, 2008 - Tese de Mestrado).

Os núcleos marcados com Tunel na EGL do grupo ETOH foram observados com maior frequência na zona subventricular, como demonstrado na Figura 17, enquanto no córtex, a marcação mostrava-se ao longo de toda a lamina cortical, o que foi mais observado no grupo alcoolizado (Figura 20).

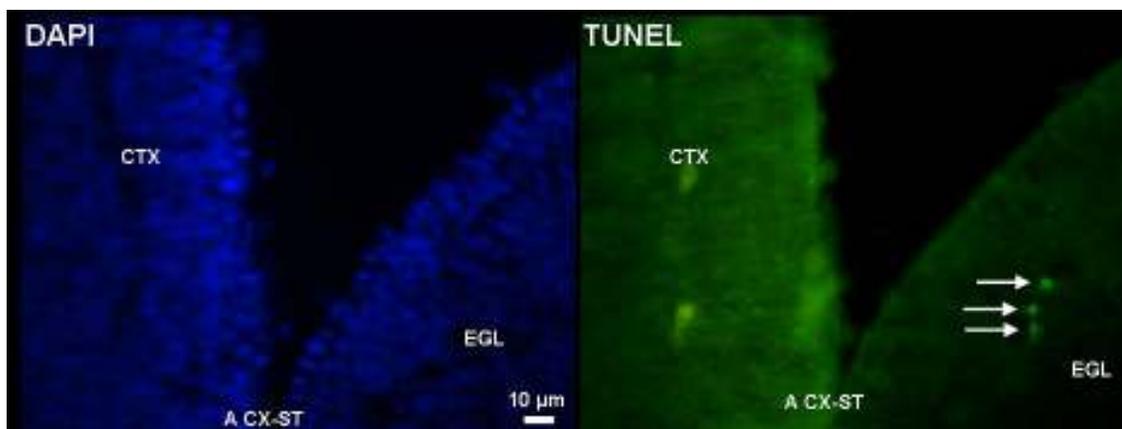


Figura 17: Fotomicrografia de marcação de TUNEL em encéfalo alcoolizado (2,0g/Kg ETOH) indicando (setas) núcleos apoptóticos localizados na zona subventricular da eminência ganglionar lateral (EGL), próximo ao ângulo córtico-estriatal (A CX-ST). Indicado: córtex cerebral (CTX).

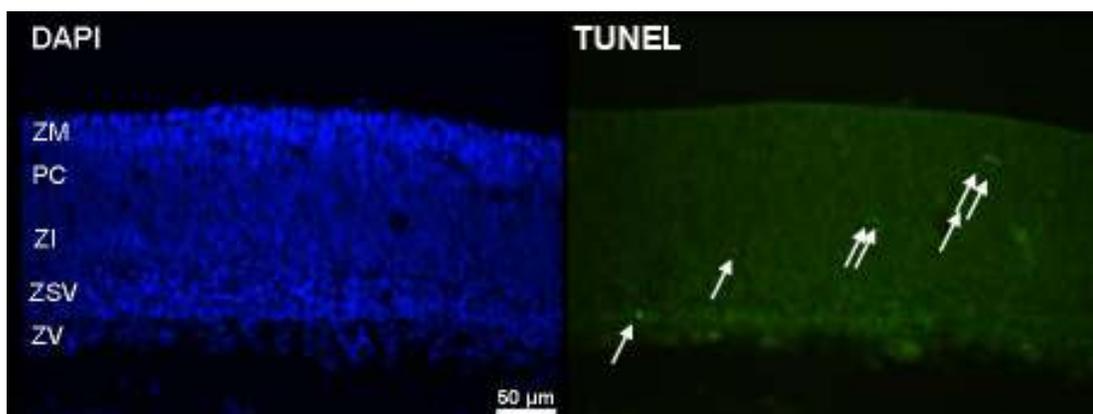


Figura 18: Fotomicrografia de marcação de TUNEL em córtex alcoolizado a 2,0g/Kg de etanol, indicando (setas) notes apoptóticos localizados em camadas distintas. Indicados: zona marginal (ZM), placa cortical (PC), zona subventricular (ZSV) e zona ventricular (ZV) com marcação de DAPI (azul) e TUNEL (verde).

4.7. TESTE DE COMPORTAMENTO (CAMPO ABERTO)

Através do teste de campo aberto (*Open Field*), avaliamos o comportamento dos camundongos controle e alcoolizados quanto a sua atividade locomotora e exploratória em ambiente previamente desconhecido. Após o último dia de tratamento com etanol a 2g/Kg (E14), os animais foram mantidos no biotério até atingirem a idade P180.

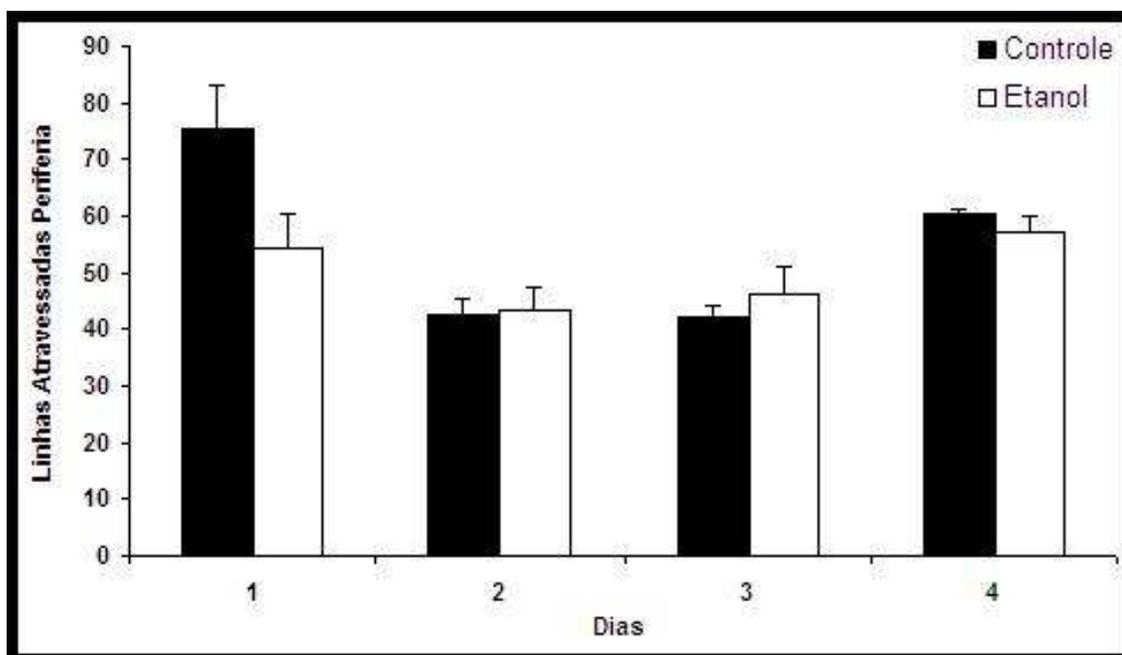


Gráfico 3: Média e erro padrão do deslocamento periférico de camundongos adultos P180 dos grupos controle (CON) e etanol (ETOH) durante os dias 1, 2, 3 e 4 de teste de campo aberto (n=8).

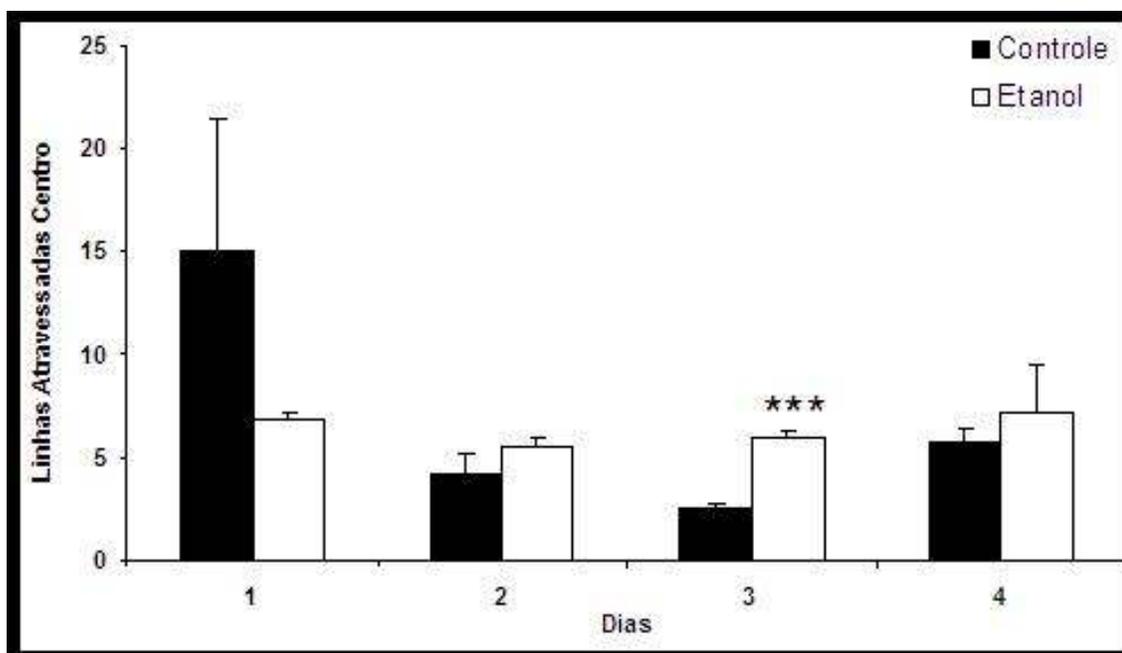


Gráfico 4: Média e erro padrão do deslocamento no centro da arena, de camundongos adultos P180 dos grupos controle (CON) e etanol (ETOH), durante os dias 1, 2, 3 e 4 de teste de campo aberto (n=8). *** valor de $p < 0,0001$.

O grupo ETOH não apresentou qualquer alteração na atividade locomotora espontânea, nas regiões periféricas da arena (Gráfico 3).

Somente houve aumento da atividade locomotora na parte central da arena no terceiro dia (CON, $2,6 \pm 0,21$ e ETOH $5,95 \pm 0,38$, $p < 0,001$), como pode ser visto no Gráfico 4. Este dado indica desinibição aos fatores de risco em ambiente inicialmente desconhecido, porém a atividade locomotora média total não foi alterada com 2g/Kg de etanol.

Atividades exploratórias do ambiente, entretanto, apresentaram redução significativa no grupo ETOH no dias 1 (CON, $10,45 \pm 0,6$ e ETOH $8 \pm 0,42$, $p = 0,007$), 2 (CON, $9,25 \pm 0,58$ e ETOH $7,6 \pm 0,28$, $p = 0,0015$) e 4 (CON, $12,85 \pm 0,27$ e ETOH $8,55 \pm 0,37$, $p < 0,0001$) como indicado no Gráfico 5.

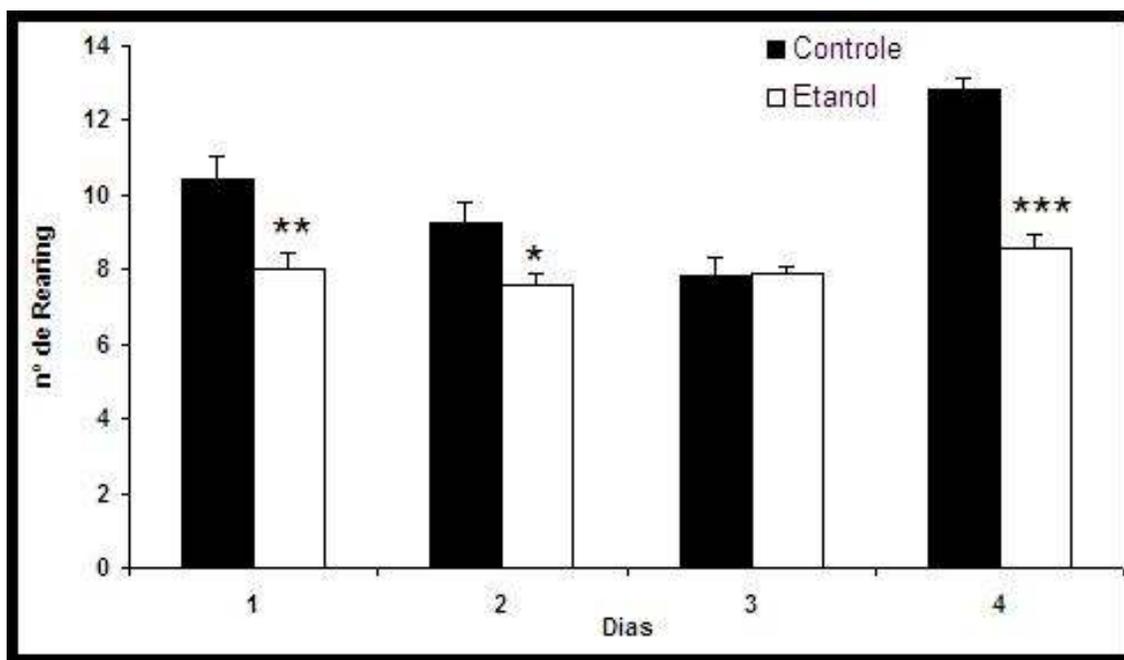


Gráfico 5: Média e erro padrão de atividade exploratória de elevação do corpo com patas dianteiras suspensas (*rearing*), de camundongos adultos P180 dos grupos controle e etanol, durante os dias 1, 2, 3 e 4 de teste de campo aberto (n= 8). Valores de $P < 0,01$ *, $P < 0,001$ ** e $P < 0,0001$ ***.

Ao quarto dia, o aumento da atividade exploratória no grupo CON não foi acompanhado pelo grupo ETOH (Gráfico 5).

O movimento de limpar vibrissas com as patas dianteiras (*grooming*) também indica atividade exploratória, principalmente, através do sistema somestésico, que atende às aferências das informações vindas das vibrissas em roedores. Nossos experimentos revelaram redução dessa atividade somente nos dias 1 (CON, $3,05 \pm 0,49$ e ETOH $2,18 \pm 0,08$, $p=0,032$) e 2 (CON, $2,4 \pm 0,39$ e ETOH $1,6 \pm 0,13$, $p=0,032$) do grupo ETOH (Gráfico 6). Posteriormente, os animais se comportaram de forma semelhante ao grupo controle.

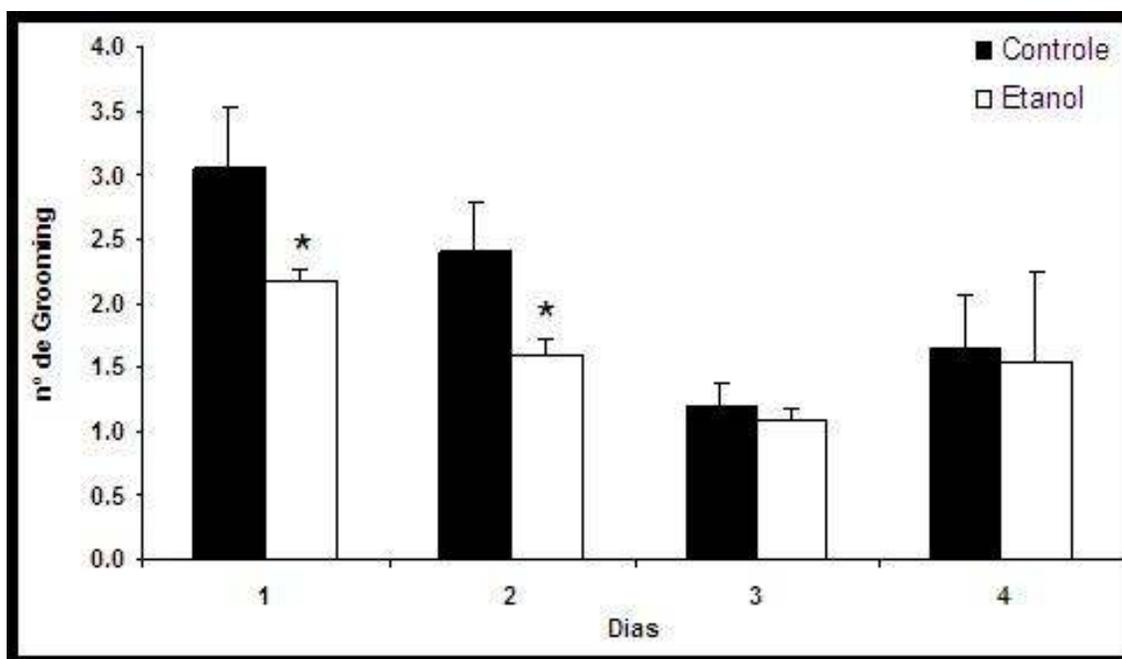


Gráfico 6: Média e erro padrão de movimento de coçar as vibrissas (*grooming*), de camundongos adultos P180 dos grupos controle e etanol, durante os dias de teste de campo aberto (n=8). Valores de $P < 0,01$ *.

Um indicativo de estresse durante o teste de campo aberto pode ser avaliado pelas fezes depositadas na arena, como indica o Gráfico 7. Estes valores foram significativamente aumentados nos quatro dias de teste.

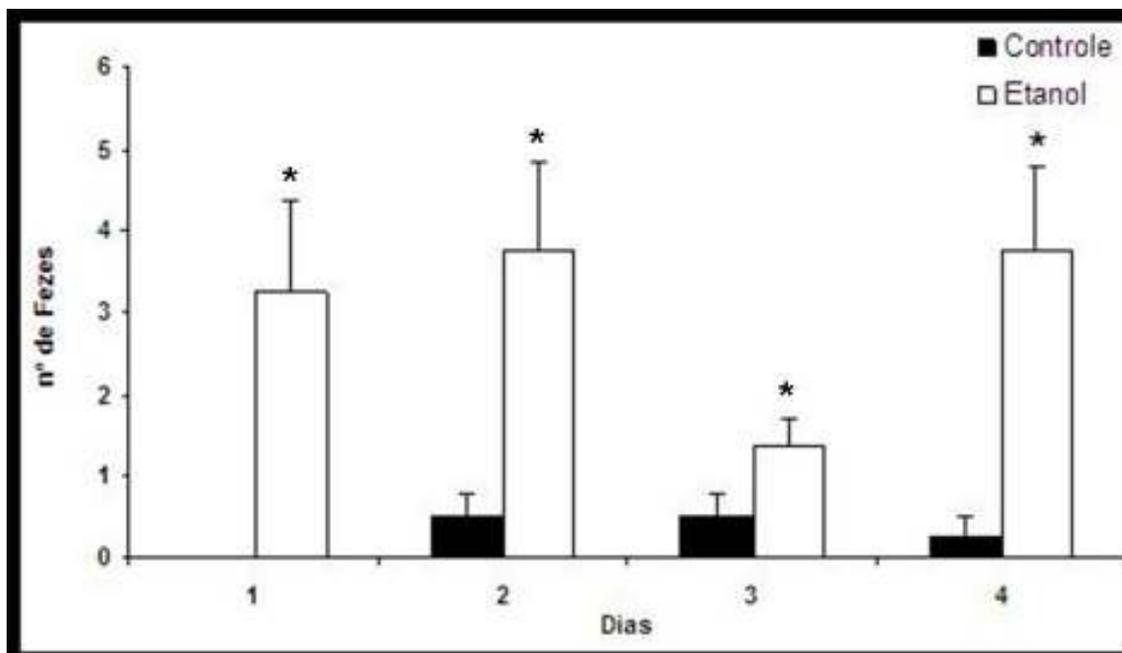


Gráfico 7: Média e erro padrão do número de depósito de fezes de camundongos adultos na idade P180 dos grupos controle e etanol, nos dias 1, 2, 3 e 4 de teste de campo aberto (n=8). Valores de $P < 0,01$ *.

Embora não esteja documentado, também foi observado em testes piloto à altas doses de etanol (3,5g/Kg) em camundongos P40, que havia redução significativa da atividade locomotora no grupo ETOH (3,5g/Kg, via i.p.).

5. DISCUSSÃO

5.1. MODELOS DE EXPOSIÇÃO AO ETANOL

Existem modelos variados de administração de etanol em estudos envolvendo alcoolismo fetal, dos quais a maioria são modelos crônicos de administração alcoólica na água, como preconizado por Miller e colaboradores em 1983. Modelos de alcoolismo crônico podem ter efeitos distintos quando comparados aos episódios curtos de administração alcoólica. A administração de álcool a 2,0g/Kg veio de encontro aos estudos de Miller e colaboradores (1999), sendo uma dose adequada e não abortiva em 100% dos casos para estudos em camundongos. Livy e colaboradores (2003) administraram etanol por duas vias distintas e demonstraram que a gavagem intragástrica era consideravelmente menos tóxica do que a via intraperitoneal (i.p.) tanto em ratos como em camundongos adultos. Isto ocorre porque a gavagem não eleva as concentrações plasmáticas de etanol a níveis tão altos como a administração i.p. já que há quantidades consideráveis de álcool desidrogenase no estômago de camundongos. Acreditamos que nossos achados sobre o efeito sedativo bem como o modo de administração do etanol foram compatíveis aos demonstrado por Livy e colaboradores (2003). Entretanto, fomos surpreendidos ao observarmos que doses altas de 3,5g/Kg, compatíveis à administração utilizada em camundongos por estes autores (3,8g/Kg), causavam alta incidência de aborto em nossos experimentos pilotos. Isto sugere que tais doses podem ser letais aos embriões mesmo em episódios relativamente curtos (4 dias). Observamos, também, que a curva de concentrações plasmáticas de etanol em fêmeas grávidas foram mais elevadas do que a encontrada numa não grávidas (Gráfico 1). Isto explicaria, parcialmente, por quê uma determinada dose de álcool

pode ser mais tóxica em encéfalo embrionário do que no adulto. O decaimento da curva de concentrações plasmáticas ao longo do tempo, entretanto, mostrou-se similar para as fêmeas grávida e nulípara. Ainda que tenhamos apresentado dados similares ao que existe na literatura, não sabemos qual seria a dose mínima capaz de induzir mudanças no padrão de expressão de GABA no modelo proposto. É provável que a expressão do neurotransmissor possa estar aumentada em modelos crônicos de alcoolismo fetal, e diminuída em modelos de concentrações alcoólicas altas, como foi observado em nossos testes-piloto de 2 e 3,5g/kg, respectivamente. Além disso, os efeitos específicos de diferentes doses de etanol, entretanto, sob cada sub-população de precursores GABAérgicos pode desenhar um panorama ainda mais complexo e seletivo. O protocolo utilizado neste trabalho ainda não havia sido testado por outros pesquisadores e mostrou-se adequado para estudos do sistema GABAérgico em formação.

5.2. ETANOL E COMPORTAMENTO

A Síndrome alcoólica fetal (FAS) está relacionada a várias alterações comportamentais (BOERNGEN-LACERDA *et al.*, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2005; CORREA *et al.*, 2003; DURSUN *et al.*, 2006). Em camundongos Suíços pós-natos, observa-se um efeito estimulante ou ansiolítico com redução do medo e aumento da atividade locomotora espontânea e exploratória (BOERNGEN-LACERDA *et al.*, 2000). Os autores levantaram a hipótese de que drogas de abuso, como o álcool, poderiam ter efeito de alça tanto positiva como negativa sob tais alterações em animais adultos. Já a exposição pré-natal de etanol tem sido mais amplamente estudada em ratos, como relatado por Carneiro e colaboradores (2005). Estes autores demonstraram que a exposição pré-natal ao etanol durante todo o período

gestacional diminuiu a atividade locomotora espontânea e atividade exploratória. Pesquisas mais recentes realizadas por Dursun e colaboradores (2006) demonstraram que o álcool quando administrado entre E7 e E20 a 350 mg/dL não tem efeito sobre a retenção e memória de trabalho ou alterações no aprendizado, mas sugere-se neofobia aumentada sem hiperatividade do grupo alcoolizado. Este trabalho postula que muitos dos efeitos do alcoolismo fetal podem surgir ou precipitar-se com o envelhecimento. Nosso trabalho indica, de forma semelhante, que o etanol a 2g/Kg administrado apenas entre E11 e E14 não é capaz de afetar a atividade locomotora de animais pós-natais, mas sugere fobia aumentada. Acreditamos que a aprendizagem espacial do ambiente pode ser mais afetada quando administrações alcoólicas ocorrem após o período gestacional P4 - P9, na fase do período crítico, como discutido por Dursun e colaboradores (2006). Este dado comportamental abre uma discussão se o etanol teria efeito mais pronunciado sobre os circuitos corticais em processo de maturação funcional ou de intensa sinaptogênese. Em nosso trabalho, a ausência de efeitos comportamentais mais pronunciados reforça esta hipótese, já que não pudemos inferir, através do teste de campo aberto, que estes animais apresentavam alterações esperadas da SAF. O teste em nosso trabalho avaliou o comportamento dos animais na idade P180 e os de Dursun e co-autores (2006) entre P80 e P147. Entretanto, para nosso conhecimento, até o momento, nenhum trabalho foi realizado mostrando os possíveis efeitos comportamentais em animais idosos submetidos ao modelo de alcoolismo fetal. Portanto, apresentamos e sugerimos com este trabalho, que a administração alcoólica em períodos gestacionais relativamente curtos não é capaz de induzir a SAF em camundongos.

5.3. FORMAÇÃO DO SISTEMA GABAÉRGICO SOB EXPOSIÇÃO AO ETANOL

Diferentemente do SNC adulto, é importante lembrarmos que o GABA tem função excitatória no encéfalo embrionário (BEN-ARI, *et al.*, 2007). O balanço excitação-inibição no córtex adulto, conta com os ajustes refinados da atividade GABAérgica (inibitória) nos botões sinápticos para contrapor-se aos circuitos excitatórios glutamatérgicos. Portanto, a função excitatória do GABA no desenvolvimento sugere que a ausência ou escassez de conectividades dá ao tecido embrionário a possibilidade de utilizar-se de um tipo de GABA transitório, capaz de estimular e auxiliar os eventos do desenvolvimento para a formação do encéfalo. Entretanto, ainda não se sabe ao certo qual a função desempenhada pelo GABA nem sua importância na formação das vesículas telencefálicas e do sistema GABAérgico telencefálico. Não há trabalhos mostrando alterações na expressão do GABA no telencéfalo ventral em alcoolismo durante o início da migração tangencial e as prováveis via de sinalização envolvidas ainda se restringem aos neurônios migrantes radialmente. Alguns estudos sobre drogas de abuso nos induzem a pensar num possível papel excitatório do GABA sobre este tipo de migração em modelos toxicológicos. É curioso pensarmos que uma droga estimulante, como a cocaína por exemplo, impede os interneurônios de migrarem tangencialmente e atingirem seus alvos corticais (CRANDALL *et al.*, 2004). Em oposição a este, poderíamos supor que o álcool, caracterizada como uma droga com efeito sedativo poderia opor-se ao efeito da cocaína. Então, cumpriria ao etanol predispor o encéfalo embrionário alcoolizado ao aumento do potencial migratório desses precursores GABAérgicos. Nossos experimentos não demonstram aumento da migração, mas sugere um aumento da expressão de GABA e GAD na EGL sem qualquer prejuízo para a migração tangencial no modelo estudado. Poderíamos com

isso, supor que células ectópicas em modelos de alcoolismo crônico podem ser provenientes até mesmo de precursores do telencéfalo ventral. Não sabemos, entretanto, se em nosso modelo o receptor GABA_A poderia, especificamente, provocar a formação de aglomerados de células ectópicas nas camadas superficiais do córtex parietal, como foi observado recentemente por Heck e colaboradores (2007) ao utilizar um antagonista GABAérgico em tecido cortical.

As alterações do sistema GABAérgico podem ocorrer indiretamente, via receptores de GABA. Bailey e colaboradores (2004) confirmam que o etanol aumenta a expressão dos receptores GABA_A. Outros trabalhos demonstram que o receptor GABA_B, quando bloqueado, promove acúmulo das células que migram tangencialmente nas zonas ventricular e subventricular. Isto é acompanhado por menor número de células na zona marginal, placa cortical e camadas profundas da zona intermediária como ditam os autores (LÓPEZ-BENEDITO *et al.*, 2003). O neurotransmissor GABA parece ter influência na motilidade de diferentes populações celulares, dependendo da concentração em que esteja presente no meio e do receptor estimulado (BEHAR, 1998; LOPEZ-BENDITO, 2003). Sabe-se que o bloqueio específico de receptores GABAérgicos leva a alterações em diversas etapas da migração como na saída dos interneurônios da zona ventricular (LOPEZ-BENDITO *et al.*, 2003) e na passagem através do ângulo córtico-estriatal (CUZON *et al.*, 2006). Desta forma, modelos de administração de etanol em janelas diferentes de desenvolvimento, utilizando o bloqueio ou a superestimulação de receptores de GABA poderiam evidenciar alterações no padrão de precursores GABAérgicos. Estas células ultrapassam o sulco córtico-estriatal migrando no telencéfalo dorsal a partir de E11,5 por rotas superficiais ao longo da zona marginal, ou rotas profundas ao longo da zona intermediária a partir de E12,5 (revisito por MARIN &

RUBENSTEIN, 2000). Tais eventos parecem ter envolvimento do neurotransmissor GABA através de seu receptor GABA_A (CUZON *et al.*, 2006). Além disso, devemos lembrar que o receptor GABA_A, particularmente, possui um sítio específico de ligação para o álcool (KORPI *et al.*, 2007). Portanto, ainda que não tenhamos demonstrado grandes alterações do contingente de células GABAérgicas atingindo o córtex, alguma alteração na capacidade migratória dessas células pode ocorrer via alteração do receptor GABA_A em doses distintas. Não há trabalho, até o momento, que indique a dose mínima capaz de alterar este receptor e influenciar a gênese ou migração nos modelos de exposição pré-natal ao etanol.

De acordo com Hevner e colaboradores (2004), os precursores GABAérgicos, independente do momento de sua origem, migram em direção ao ventrículo a partir da zona marginal e em direção à pia a partir da borda entre a zona intermediária e a zona subventricular, enquanto neurônios de projeção nascidos tardiamente migram somente em direção à pia a partir da zona intermediária para posições definidas na placa cortical. Os precursores de interneurônios migrantes estendem numerosos ramos em direção ao alvo e são capazes de se mover de um alvo para outro, migrando sobre corpos celulares de neurônios pós-mitóticos, entre prolongamentos de células gliais e axônios cortico-fugais. É descrito na literatura que na SAF há redução da taxa de migração ao longo de todo o desenvolvimento (MILLER, 1993). Nossos resultados, entretanto, propõem que em modelos não-crônicos de alcoolismo durante o início da migração tangencial não houve interferência significativa na capacidade migratória dessas células. Mas o aumento de células GABA⁺ e da expressão de GAD65/67 levanta possibilidade para o efeito contrário, de promover população GABAérgica extranumerária podendo predispor o

surgimento de células ectópicas alojadas em diferentes regiões da laminação cortical normal.

Sabendo-se que as células GABAérgicas ultrapassam o sulco córtico-estriatal migrando no telencéfalo dorsal a partir de E11,5 por rotas superficiais, ou profundas pela zona intermediária (revisto por MARIN & RUBENSTEIN, 2001), nossos experimentos causaram intoxicação no período crítico deste evento. Não observamos qualquer diferença no número de células migrantes próximo ao ângulo córtico-estriatal ou zona intermediária. Comprovando que a dose de 2g/Kg de ETOH em E11 - E14 não prejudica a migração tangencial. O fato de observarmos aumento de GABA e GAD65/67 sem aumento da migração vai de encontro com o trabalho de Alifragis e colaboradores (2004), ao demonstrar que a expressão de *lhx6* em neurônios da EGM poderia prejudicar a migração tangencial sem alterar a produção de GABA e GAD (ALIFRAGIS *et al.*, 2004). Entretanto este trabalho não expõe o encéfalo embrionário ao etanol e é contraditório com as revisões de Ben-ari e colaboradores (2007).

Os estudos em fatias também levantam discussões sobre nosso trabalho. TANAKA e colaboradores (2003, 2006) mostraram que as células GABAérgicas são capazes de migrar em diversas direções nas fatias do telencéfalo. Além disso, o grupo de Rakic (ANG *et al.*, 2003) mostrou que as células migram em diversas direções antes de penetrar a placa cortical em formação, onde se estabelecerão como interneurônios GABAérgicos. Uma região cortical que vem sendo extensivamente estudada é o córtex somestésico primário de roedores, que inclui a região dos barris, mais especificamente o subcampo pósteromedial, onde se localiza a representação das maiores vibrissas do animal. Esta região apresenta uma organização característica, com as aferências talâmicas chegando à camada IV

de maneira ordenada, compreendendo o interior dos barris, enquanto sua parede é formada essencialmente de interneurônios GABAérgicos. Isto confere um grande confinamento da informação processada, possibilitando a localização precisa da vibrissa estimulada (revisto por ERZURUMLU & KIND, 2001). Sabemos, entretanto que esta estrutura sofre maturação e períodos pós-natais a partir de P3. Como, então o etanol atuaria num sistema que ainda irá se organizar no pós-nato? Nossos dados, ao demonstrar que etanol não alterou o número de células GABAérgicas no córtex parietal (região correspondente aos barris), sugere que este efeito não incluiu, em nosso modelo, a janela temporal crítica para o comprometimento e maturação dos sistemas inibitórios do córtex somestésico, que é o período neonatal. Esta hipótese pode ser melhor compreendida ao compararmos nosso modelo ao modelo estudado por Bailey e colaboradores (2004), que observaram decréscimo seletivo de neurônios GABA ou GAD+ no córtex somestésico de porcos da Índia expostos ao etanol nos períodos pré-natal e pós-natal logo após o nascimento, incluindo o período de formação dos barris. Portanto, o córtex parietal deve sofrer maior influência do álcool nos períodos de intensa sinaptogênese, quando ocorre a maturação dos septos com marcação densa de células GABAérgicas.

Sugere-se certo grau de especificidade regional na dispersão da população GABAérgica e, segundo Bayer e colaboradores (1987), o córtex cerebral apresenta um gradiente látero-medial de maturação. As células GABAérgicas podem ser divididas em subpopulações de interneurônios inibitórios dispersas nas diferentes camadas corticais. Para o bom funcionamento do córtex é necessário, que estas células GABAérgicas ocupem as camadas corretas e estabeleçam circuitos adequados (DOUGLAS & MARTIN, 2004). De acordo com o proposto pelo grupo de Marin (FLAMES *et al.*, 2007; FOGARTY *et al.*, 2007), o telencéfalo ventral apresenta

diferentes nichos delimitados pela expressão diferencial de genes, onde cada combinação de genes leva à geração de uma população cortical específica. Isto também é observado por outros estudos, ao mostrarem que as células destinadas às camadas V-VI apresentam pico de neurogênese em E16, as que ocuparão a camada IV nascem em E17 e, por fim, no final da gestação aquelas que compõem as camadas mais superficiais (II-III) (RYMAR & SADIKOT, 2007). Assim sendo, é possível que as alterações observadas por Bailey e colaboradores (2004) descritas acima também seja pelo fato do modelo de alcoolismo incluir intoxicação a partir de E17, quando o telencéfalo em desenvolvimento deveria receber os precursores GABAérgicos destinados às camadas mais superficiais (II/III).

As eminências ganglionares e a via migratória tangencial são fontes de células GABAérgicas e calbindina positivas neocorticais (ANDERSON *et al.*, 1997; TAMAMAKI *et al.*, 1997; LAVDAS *et al.*, 1999). Observamos em nossos experimentos prévios que etanol a 3,5g/Kg resultou em diminuição de células imunoreativas para calretinina nas porções mais rostrais do telencéfalo em E14. Quase todas as células migrantes tangenciais, que expressam a GAD65, alojam-se preferencialmente nas camadas II/III do córtex cerebral e co-expressam calretinina (LÓPEZ-BENDITO *et al.*, 2004). Sugere-se que o destino dessas células nas diferentes camadas corticais esteja relacionado ao período de geração. Segundo os estudos de Rymar e Sadikot (2007), as células calretinina-positivas ocupam as camadas corticais da mais superficial para a mais profunda, ou seja, os interneurônios das camadas II-III, IV e V-VI apresentam neurogênese máxima em E16, E17 e E19 respectivamente. Já os estudos de Yozu e colaboradores (2004) relatam que as células calretinina nascem em E12,5 e localizam-se em torno das camadas II/III do córtex. A maioria dos interneurônios expressando parvalbumina

deriva da EGM, enquanto que aqueles expressando calretinina originam-se predominantemente na EGC (WICHTERLE *et al.*, 2001; VALCANIS & TAN, 2003). Nossos experimentos prévios demonstram que há geração de células calretinina positivas, também na porção rostral do telencéfalo em E14 e, que nosso protocolo incluiu intoxicação no período de gênese dessas células. Podemos supor que a redução de células calretinina em nosso modelo a 3,5g/Kg indica um prejuízo seletivo e maior vulnerabilidade dos interneurônios calretinina positivos. Tanaka e colaboradores (2006), mostraram que neurônios GAD67 ligadas ao promotor da proteína fluorescente verde (do inglês, GFP) apresentam uma dispersão não somente látero-medial, mas também ântero-posterior através das zonas marginal e ventricular. Portanto, aquelas células calretinina positivas localizadas nas porções mais rostrais podem responder como um contingente de células para as regiões mais caudais. Segundo Tanaka e co-autores (2006), estas células poderiam migrar a distâncias de 400µm em apenas 1,5 dias no córtex parietal e atingem até 800µm no eixo ântero-posterior após 3 dias. Através de experimentos com animais mutantes, sugere-se, que a população de interneurônios corticais que expressa calretinina deriva, principalmente, da eminência ganglionar caudal (XU *et al.*, 2004). Mas nossos dados confirmam a presença de células calretinina positivas nas porções mais rostrais. Trabalhos mais recentes levantam a hipótese de que estas células calretinina-positivas nas porções mais rostrais são a fonte de células Cajal-Retzius (BYSTRON *et al.*, 2006). Pla e colaboradores (2006) investigaram o papel da Relina na migração de interneurônios, tanto na fase de dispersão tangencial como no seu deslocamento radial. Eles mostraram que o número e as rotas de migração durante estágios embrionários depende da sinalização de Relina e a sua disfunção pode alterar drasticamente a localização dos interneurônios corticais no adultos (HEVNER

et al., 2004). As células Cajal-Retzius estão presentes durante o desenvolvimento durante o qual migram tangencialmente por influência de uma quimiocina para sua dispersão e permanência na zona marginal. Através da produção de Relina estas células influenciam a distribuição de outros neurônios migrantes ao longo das camadas (YABUT *et al.*, 2007). Nossos experimentos, ao demonstrar uma diminuição de células calretinina positivas - possivelmente futuras células de Cajal-Retzius sinalizadoras de migração pela relina - levanta uma discussão importante sobre o efeito do etanol sobre a migração neuronal. Como o etanol reduz a expressão de BDNF (HEATON *et al.*, 2000; LIGTH *et al.*, 2001; MAIER *et al.*, 1999; CLIMENT *et al.*, 2002), que por sua vez modula a organização espacial tanto de células Cajal-Retzius como de interneurônios GABAérgicos (ALCÂNTARA *et al.*, 2005) episódios curtos de exposição ao etanol em altas doses pode desorganizar o córtex numa seqüência de alteração da gênese de células calretinina positivas. Portanto, a diminuição de células calretinina positivas na região rostral refletiria uma redução de células Cajal-Retzius, que por sua vez sinalizariam erroneamente para neurônios migrantes (tanto de projeção como interneurônios) já que a síntese de relina não seria normal nem homogênea. Além disso, teríamos uma migração intracortical neuronofílica de interneurônios prejudicada, já que estes necessitam comunicar-se com células de Cajal-Retzius de mesma idade durante a migração. Observamos nas regiões corticais que a administração de 3,5g/Kg de ETOH gera uma dispersão não homogênea de células calretinina positivas ao longo da zona marginal. Isto levanta uma hipótese de que a distribuição descontínua destas células e, portanto, das futuras células de Cajal-Retzius, poderia se tornar anômala no desenvolvimento e comprometer a fonte de células produtoras de relina. Esta

hipótese das células calretinina serem as células de Cajal-Retzius pode ser acessadas no trabalho de Bystron e colaboradores (2006).

A atividade da enzima de síntese do GABA (GAD) está intimamente relacionada ao desenvolvimento e função do sistema GABAérgico no desenvolvimento. Existem duas principais isoformas de GAD com propriedades particulares (KAUFMAN *et al.*, 1986) em várias áreas do cérebro (JULIEN *et al.*, 1987). A GAD65 está mais concentrada nos terminais nervosos e possivelmente associada à vesículas sinápticas, enquanto GAD67 é encontrada uniformemente no citoplasma, sendo facilmente detectada no corpo celular e dendritos (SHEIKH & MARTIN, 1996). Durante o desenvolvimento, é provável que a expressão da GAD seja uniforme já que esta ainda não cumpre seu papel funcional de atividade sináptica, mas sim de síntese de GABA. Animais nocaute para GAD67 morrem ao nascimento (CONDIE *et al.*, 1997), e a GAD65 não compensa a perda parcial da outra isoforma. Entretanto, camundongos GAD65^{-/-} são viáveis, mas desenvolvem epilepsia e alterações comportamentais. Nosso trabalho não identificou alteração específica da GAD65 ou GAD67 como foi apresentado nos dados de *western blot*, o que nos sugere que tais alterações ainda poderiam ajustar-se aos níveis de expressão fisiológica da proteína, sem comprometer a viabilidade do feto. Entretanto, podemos supor que doses mais altas de ETOH podem comprometer, mais severamente, a expressão da GAD67 podendo levar a falência estrutural dos precursores GABAérgicos.

Devemos lembrar que a população GABAérgica neocortical compreende uma menor parcela da população neuronal total (~20%) e, diferentemente dos neurônios piramidais, não estabelecem conexões com regiões distantes, sendo portanto interneurônios de circuitaria local. Entretanto, apresentam propriedades anatômicas,

eletrofisiológicas e moleculares diversificadas (FREUND & BUZSAKI, 1996; KAWAGUCHI & KUBOTA, 1997; MARKRAM *et al.*, 2004). Uma vez que os circuitos locais são balanceados por estas células, diferenças em suas concentrações ao longo das diferentes camadas corticais podem ser críticas para o encéfalo em formação. A degeneração dos interneurônios inibitórios do córtex cerebral e/ou a formação de circuitos corticais anômalos com distúrbios de hiperexcitabilidade neocortical são descritos em modelos de epilepsia (SANABRIA *et al.*, 2002). Silva e colaboradores (2002) observaram diminuição da espessura no córtex somestésico de ratos submetidos ao modelo de epilepsia do lobo temporal neonatal, acompanhado de uma redução específica de sub-populações de interneurônios GABAérgicos (GAD65) e alteração do transportador de GABA. Alterações neocorticais também são demonstradas em modelos animais de convulsões em camundongos (TURSKI *et al.*, 1984; BORGES *et al.*, 2003). Portanto, parece plausível que defeitos na formação do sistema GABAérgico pode ser importante para entendermos os mecanismos envolvidos nas epilepsias corticais, prevalentes em neonatos. A implantação de células precursoras GABAérgicas já têm sido realizada em alguns modelos animais (WICHTERLE *et al.*, 1999) e estudos mais recentes almejam implantar células ou precursores GABAérgicos na terapia celular em córtices epileptogênicos ou epiléticos (THOMPSON & SUCHOMELOYA, 2004; LOSCHER *et al.*, 1998; LINDVALL & BJORKLUND, 1992; SANABRIA *et al.*, 2002). Tal estratégia poderia promover a integração das células precursoras GABAérgicas no neocórtex com prognóstico de melhoras em crises convulsivas devido a uma restauração do balanço excitatório/inibitório do córtex cerebral. Não sabemos se a epilepsia poderia ocorrer no modelo proposto no presente trabalho. Poderíamos esperar até uma maior predisposição à crises convulsivas no neonato previamente

exposto ao álcool, já que o GABA em períodos precoces do desenvolvimento ainda não possui transportadores de íons cloreto (KCC2) e ainda cumpre uma função despolarizante, como comentado na Figura 5 da introdução.

Outro fator importante nos modelos de alcoolismo fetal é a morte celular programada induzida por toxicidade. Existem controvérsias quanto à região que deve ser mais densamente marcada por TUNEL. Os estudos de Miller revelam que o etanol aumenta a morte, preferencialmente, em regiões corticais (MILLER, 2006). Esta deve ser a razão pela qual encontramos mais marcação de TUNEL no córtex cerebral. A morte neuronal em áreas corticais pode chegar à 60%, como visto na introdução deste trabalho. Entretanto, nossos dados indicam valores muito abaixo das taxas encontradas em modelos crônicos de alcoolismo fetal, indicando que a morte celular pode ter efeito dependente do tempo de exposição ao etanol.

A literatura descreve que os neurônios nas camadas mais superficiais e camadas mais profundas do córtex são os mais passíveis de morte quando comparado aos neurônios das porções mais internas. Além disso, interneurônios de circuitos locais são mais propensos à morte quando comparados aos neurônios de projeção (MILLER, 2006). Acreditamos que células TUNEL+ dispostas ao nível da zona intermediária, podem constituir parte dos interneurônios GABAérgicos migrantes, já que na idade E14 há muitas destas células migrando majoritariamente pela zona intermediária. Nossos estudos mostraram maior marcação de TUNEL no córtex dos animais alcoolizados, confirmando a maior sensibilidade dessa estrutura à morte celular. Em experimentos preliminares não incluídos nesta tese, os núcleos TUNEL+ não colocalizaram com a marcação imuno-histoquímica para GABA (dados não mostrados), mas acreditamos que isto ocorre devido ao fato das células apoptóticas perderem sua capacidade de sintetizar GABA durante a morte neuronal.

A marcação de TUNEL esteve presente em todas as camadas do córtex, o que sugere que há morte tanto de células GABAérgicas como glutamatérgicas do córtex em formação. Devemos lembrar, entretanto, que os núcleos marcados na zona subventricular da EGL (Figura 18) são células com fenótipo GABAérgico intrinsecamente pré-determinado. Portanto, o aumento significativo de TUNEL na EGL sugere perda de células precursoras GABAérgicas no modelo estudado. Neste caso, a estrutura alvo destas células a ser prejudicada deve ser o bulbo olfatório, que recebe células provenientes da EGL. Bolteus e Bordey (2004) demonstram que o GABA pode reduzir a taxa de migração da corrente migratória rostral (para o bulbo olfatório) via ativação do receptor GABA_A (BOLTEUS & BORDEY, 2004). Podemos supor, com isto, que o receptor GABA_A deve ser avaliado com detalhe em modelos que comprometam células GABAérgica destinada ao bulbo olfatório. Nossos dados, entretanto, sugere que o efeito de aumento na morte celular nesta estrutura não teria grande impacto no futuro bulbo olfatório, já que a EGL apresentou maior expressão protéica da enzima de síntese (GAD65/67) e também do neurotransmissor (GABA) no modelo proposto.

Finalmente, alguns autores sugerem que quanto mais tardia a administração de etanol no desenvolvimento, anatomicamente, mais superiores serão as estruturas alvo da toxicidade (IKONOMIDOU & TURSKI, 1995; OLNEY *et al.*, 2000). Não sabemos, entretanto, se isto seria verdadeiro para a formação das células GABAérgicas neocorticais, já que estas são originadas na parte basal do telencéfalo (precocemente) e depois, tornam-se parte integrante de um sistema inibitório difuso e presente em todos os circuitos cerebrais em vários níveis. Cada estrutura possui um período de maior sensibilidade ao etanol, como por exemplo o cerebelo, hipocampo, córtex e estrutura do tronco encefálico e isto depende de um refinado

programa ontogenético de cada estrutura e tecido ou até mesmo de células específicas. O presente trabalho apresentou novas perspectivas sobre os efeitos do etanol num período pré-natal que pode ser considerado crítico para a formação do telencéfalo embrionário e a formação do sistema GABAérgico telencefálico. Existe forte especulação quanto aos neurônios inibitórios serem mais danificados por fatores nocivos em relação aos neurônios excitatórios. Os efeitos do etanol sobre cada subpopulação de interneurônios inibitórios no telencéfalo, entretanto, ainda não foram investigados e pode ser objeto de estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

Etanol a 3,5g/Kg (E11 - E14):

- ▶ Não se adequa a protocolos de alcoolismo fetal por causar alta incidência de aborto e malformações de embriões em camundongos (E13 - E14).
- ▶ Aparentemente reduz a imunomarcacão para calretinina GABA.
- ▶ Causa déficits comportamentais no teste de campo aberto.

Etanol a 2.0g/Kg (E11 - E14):

- ▶ Não produz alterações morfológicas macroscópicas ou mesoscópicas de malformação do telencéfalo.
- ▶ Provoca aumento de morte celular na EGL CTX, sem alterações significativas na EGM e primórdio do hipocampo.
- ▶ Aumenta a expressão da GAD65/67 na EGL, sem alterar significativamente a expressão dessa proteína nas demais regiões.
- ▶ Provoca aumento significativo de GABA na EGL sem alteração deste na EGM e CTX e primórdio do hipocampo.
- ▶ Não compromete a migração tangencial dos precursores GABAérgicos para atingirem o córtex cerebral.
- ▶ Não altera o contingente de células GABAérgicas no córtex parietal adulto P40.
- ▶ Reduz a atividade exploratória e camundongos adultos, com indicativo de neofobia, sem alterações de atividade locomotora no teste de campo aberto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, S.K.; RICHARDSON, R.; SWARTZWELDER, H.S. **Developmental changes in seizure susceptibility during ethanol withdrawal.** *Alcohol*, 18(1): 23-6, 1999.

ALCÁNTARA, S.; POZAS, E.; IBAÑEZ, C.F.; SORIANO, E. **BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization.** *Cerebral Cortex*, 16(4): 487-499, 2006.

ALIFRAGIS, P.; LIAPI, A.; PARNAVELAS, J.G. **Lhx6 regulates the migration of cortical interneurons from the ventral telencephalon but does not specify their GABA phenotype.** *J.Neurosci.*, 16(24): 5643-8, 2004.

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

ANDERMANN, F. **Cortical dysplasias and epilepsy: a review of the architectonic, clinical, and seizure patterns.** *Adv. Neurol.*, 84: 479-96, 2000a.

ANDERMANN, F. **Migraine and the benign partial epilepsies of childhood: evidence for an association.** *Epileptic Disord.*, (2 Suppl 1): S37-9, 2000b.

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, 1997.

ANDERSON, S.A.; MARÍN, O.; HORN, C.; JENNINGS, K.; RUBENSTEIN, J.L.R. **Distinct cortical migration from the lateral and medial 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: 5805-5815, 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.

ANTON, E.S.; KREIDBERG, J.A.; RAKIC, P. **Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex.** *Neuron.*, 2: 277-89, 1999.

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

ASTLEY, S.J.; MAGNUSON, S.I.; OMNELL, L.M.; CLARREN, S.K. **Fetal alcohol syndrome: changes in craniofacial form with age, cognition, and timing of ethanol exposure in the macaque.** *Teratology*, 59 (3): 163-72, 1999.

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

BARDIN, G.; POLLARD, H.; GAÏARSA, J.L.; BEN-ARI, Y. **Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth cultured hippocampal neurons.** *Neurosci. Lett.*, 152: 150-154, 1993.

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. **Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life.** *J. Comp. Neurol.*, 190(1): 115-34, 1980.

BAYER, S.A.; ALTMAN, J. **Development of the preoptic area: time and site of origin, migratory routes, and settling patterns of its neurons.** *J Comp Neurol.*, 265(1): 65-95, 1987.

BEARER, C.F. **Markers to detect drinking during pregnancy.** *Alcohol Res. Health.*, 25(3): 210-8, 2001.

BEARER, C.F. **Mechanisms of brain injury: L1 cell adhesion molecule as a target for ethanol-induced prenatal brain injury.** *Semin. Pediatr. Neurol.*, 2: 100-7, 2001.

BEHAR T.N.; SCHAFFNER, A.E.; SCOTT, C.A.; BARKER, J.L. **Differential Response of Cortical Plate and Ventricular Zone Cells to GABA as a Migration Stimulus.** *The Journal of Neuroscience*, 18(16): 6378-6387, 1998.

BEHAR, T.N.; SMITH, V.; SUSAN.; KENNEDY, T.; ROBERT.; MCKENZIE, M.; JACINTH.; MARIC, IRINA.; BARKER, J.L.; **GABA_B Receptors Mediate Motility Signals for Migrating Embryonic Cortical Cells.** *Cerebral Cortex*, 11: 744-753, 2001.

BEHAR, T.N.; LI, Y.X.; TRAN, H.T.; MA, W.; DUNLAP, V.; SCOTT, C.; BARKER, J.L. **GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms.** *J Neurosci.*, 16: 1808-1818, 1996.

BEHAR, T.N.; SCHAFFNER, A.E.; SCOTT C.A.; GREENE, C.L.; BARKER, J.L. **GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex.** *Cereb. Cortex*, 10: 899-909, 2000.

BEN-ARI, Y.; GAIARSA, J.; TYZIO, R.; KHAZIPOV, R. **GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations.** *Physiol. Rev.*, 87: 125-1284, 2007.

BEN-ARI, Y.; HOLMES, G.L. **Effects of seizures on developmental processes in the immature brain.** *Lancet Neurol.*, 5: 1055-1063, 2006.

BEN-ARI, Y.; HOLMES, G.L. **The multiple facets of gamma –aminobutyric acid dysfunction in epilepsy.** *Curr. Opin. Neurol.*, 18: 141-145, 2005.

BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; CORRADETTI, R.; GAIARSA, J.L. **Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons.** *J. Physiol.*, 416: 303-325, 1989.

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.

BHAVE, S.V.; HOFFMAN, P.L. **Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA.** *J. Neurochem.*, 68(2): 578-586, 1997.

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.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.O. **Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?** *Pharmacol. Biochem. and Behav.*, 67: 225-232, 2000.

BOLTEUS, A.J.; BORDEY, A. **GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone.** *J. Neurosci.*, 24: 7623-7631, 2004.

BORGES, K.; GEARING, M.; MCDERMOTT, D.L.; SMITH, A.B.; ALMONTE A.G.; WAINER, B.H.; DINGLEDINE, R. **Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model.** *Exp. Neurol.*, 182(1): 21-34, 2003.

BORODINSKY, L.N.; O'LEARY, D.; NEALE, J.H.; VICINI, S.; COSO, O.A.; FISZMAN, M.L. **GABA-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by GABA(A) receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways.** *J. Neurochem.*, 84(6): 1411-20, 2003.

BYSTRON, I.; RAKIC, P.; MOLNAR, Z.; BLAKEMORE, C. **The first neurons of the human cerebral cortex.** *Nat. Neurosci.*, 9: 880-886, 2006.

CANCEDDA, L.; FIUMELLI, H.; CHEN, K.; POO, M.M. **Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons *in vivo*.** *J. Neurosci.*, 27(19): 5224-35, 2007.

CARNEIRO, L.M.V.; DIOGENES, J.P.L.; VASCONCELOS, S.M.M.; ARAGAO, G.F.; NORONHA, E.C.; GOMES, P.B.; VIANA, G.S.B. **Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol.** *Neurotoxicol. and Teratol.*, 27: 585-592, 2005.

CARTA, M.; MAMELI, M.; VALENZUELA, C.F. **Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability.** *J. Neurosci.*, 24(15): 3746-51, 2004.

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

CHAN, C.H.; GODINHO, L.N.; THOMAIDOU, D.; TAN, S.S.; GULISANO, M.; PARNAVELAS, J.G. **Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex.** *Cereb.Cortex*, 11: 1191-1198, 2001.

CHAUDHURI, J.D. **Alcohol and developing fetus: a review.** *Med. Sci. Monit.*, 6(5): 1031-41, 2000.

CHUN, J.J.; NAKAMURA, M.J.; SHATZ, C.J. **Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons.** *Nature*, 325(6105): 617-20, 1987.

CHUN, J.J.; SHATZ, C.J. **The earliest generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life.** *J Neurosci.*, 9(5): 1648-67, 1989.

CLARKE, P.G.; CLARKE, S. **Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena.** *Anat. Embryol. Berl.*, 193(2): 81-99, 1996.

CLIMENT, E.; PASCUAL, M.; RENAUI-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.

CONDIE, B.G.; BAIN, G.; GOTTLIEB, D.I.; CAPECCHI, M.R. **Cleft palate in mice with a targeted mutation in the gamma-aminobutyric acid-producing enzyme glutamic acid decarboxylase 67.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(21): 11451-5, 1997.

CORREA, M.; ARIZZI, M.N.; BETZ, A.; MINGOTE, S.; SALAMONE, J.D. **Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the**

ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res. Bull.*, 62(3): 197-202, 2003.

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.

CRANDALL, J.E.; HACKETT, H.E.; TOBET, S.A.; KOSOFSKY, B.E.; BHIDE, P.G. **Cocaine exposure decreases GABA neurons migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex in embryonic mice.** *Cerebral Cortex*, 14(6): 665-75, 2004.

CROWDER, T.L.; ARIWODOLA, O.J.; WEINER, J.L. **Ethanol antagonizes kainate receptor-mediated inhibition of evoked GABA(A) inhibitory postsynaptic currents in the rat hippocampal CA1 region.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303(3): 937-44, 2002.

CUZON, V.C.; YEH, P.W.; CHENG, Q.; YEH, H.H. **Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence.** *Cereb. Cortex*, 16: 1377-1388, 2006.

DECHANT, G.; BARDE, Y.A. **The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system.** *Nat. Neurosci.*, 11: 1131-6, 2002.

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): 4635-44, 2001.

DIAZ, J.; SAMSON, H. H. **Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol.** *Science*, 208(4445): 751-753, 1981.

DIAZ, G.J.; SPUHLER, P.K.; LILLIQUIST, M.W.; AMSEL, A.; LESLIE, S.M. **Effects of prenatal and early postnatal ethanol exposure on [³H] MK 801 binding in rat cortex and hippocampus.** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21: 874-881, 1997.

DOUGLAS, R.J.; MARTIN, K.A. **Neuronal circuits of the neocortex.** *Annu. Rev. Neurosci.*, 27: 419-51, 2004.

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.

DUPUY, S.T.; HOUSER, C.R. **Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation.** *J. Neurosci.*, 16: 6919-6932, 1996.

DURŞUN, I.; JAKUBOWSKA-DOĞRU, E.; UZBAY, T. **Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats.** *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2: 345-55, 2006.

EASTER, S.S.JR.; PURVES, D.; RAKIC, P.; SPITZER, N.C. **The changing view of neural specificity.** *Science*, 230(4725): 507-11, 1985.

EKŞİOĞLU, Y.Z.; SCHEFFER, I.E.; CARDENAS, P.; KNOLL, J.; DIMARIO, F.; RAMSBY, G.; BERG, M.; KAMURO, K.; BERKOVIC, S.F.; DUYK, G.M.; PARISI, J.; HUTTENLOCHER, P.R.; WALSH, C.A. **Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development.** *Neuron*, 16(1): 77-87, 1996.

ELLIS, R.E.; YUAN, J.Y.; HORVITZ, H.R. **Mechanisms and functions of cell death.** *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 7: 663-98, 1991.

ERZURUMLU, R.S.; KIND, P.C. **Neural activity: sculptor of 'barrels' in the neocortex.** *Trends. Neurosci.*, 10: 589-95, 2001.

FABRI, C.E.; FURTADO, E.F.; LA PREGA M.R. **Alcohol consumption in pregnancy: performance of the Brazilian version of the questionnaire T-ACE,** *Rev Saúde Pública.*, 41(6): 979-84, 2007.

FLAMES, N.; P.L.A.R.; GELMAN, D.M.; RUBENSTEIN, J.L.; PUELLES, L.; MARÍN, O. **Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes.** *J. Neurosci.*, 27(36): 9682-95, 2007.

FLAMES, N.; LONG, J.E.; GARRATT, A.N.; FISCHER, T.M.; GASSMANN, M.; BIRCHMEIER, C.; LAI, C.; RUBENSTEIN, J.L.; MARIN, O. **Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1.** *Neuron*, 44: 251-261, 2004.

FOGARTY, M.; GRIST, M.; GELMAN, D.; MARIN, O.; PACHNIS, V.; KESSARIS, N. **Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates**

GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci.*, 27(41): 10935-46, 2007.

FREUND, T.F.; BUZSÁKI, G. **Interneurons of the hippocampus.** *Hippocampus*, 6(4): 347-470, 1996.

GALDURÓZ, J.C.F.; CAETANO, R.B. **Epidemiology of alcohol use in Brazil.** *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 26(Supl I): 3-6, 2004.

GHOSH, A.; ANTONINI, A.; MCCONNELL, S.K.; SHATZ, C.J. **Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections.** *Nature*, 347(6289): 179-81, 1990.

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.

HANCHAR, H.J.; DODSON, P.D.; OLSEN, R.W.; OTIS, T.S.; WALLNER, M. **Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity.** *Nat. Neurosci.*, 3: 339-45, 2005.

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.

HECK, N.; KILB, W.; REIPRICH, P.; KUBOTA, H.; FURUKAWA, T.; FUKUDA, A.; LUHMANN, H.J. **GABA-A Receptors regulate neocortical neuronal migration *in vitro* and *in vivo*.** *Cereb. cortex.*, 17: 138-148, 2007.

HEMPSTEAD, B.L. **The many faces of p75NTR.** *Curr. Opin. Neurobiol.*, 3: 260-7, 2002.

HEVNER, R.F.; DAZA, R.A.; ENGLUN, C.; KOHTZ, J.; FINK, A. **Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration.** *Neuroscience*, 124(3): 605-18. 2004.

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, 1999.

IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. **Excitotoxicity and neurodegenerative diseases.** *Curr. Opin. Neurol.*, 6: 487-97, 1995.

JACOBS, J.S.; MILLER, M.W. **Proliferation and death of cultured fetal neocortical neurons: effects of ethanol on the dynamics of cell growth.** *J. Neurocytol.*, 30(5): 391-401, 2001.

JEROME, H.J. **The concept of dependence: Historical Reflections.** *Alcohol Health and Research World*, 17: 188-190, 1993.

JIMÉNEZ, D.; LÓPEZ-MASCARAQUE, L.; De CARLOS, J.A.; VALVERDE, F. **Further studies on cortical tangential migration in wild type and Pax-6 mutant mice.** *J Neurocytol.*, 31(8-9): 719-28, 2002.

JONES T. **Present and future capabilities of molecular imaging techniques to understand brain function.** *J Psychopharmacol.*, 13(4): 324-9, 1999.

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

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, 1973b.

JULIEN, J.F.; LEGAY, F.; DUMAS, S.; TAPPAZ, M.; MALLET, J.; **Molecular cloning, expression and *in situ* hybridization of rat brain glutamic acid decarboxylase messenger RNA.** *Neurosci. Lett.*, 73(2): 173-80, 1987.

KAIFMANN, D.L.; MCGINNIS, J.F., KRIEGER, N.R., TOBIN, A.J. **Brain glutamate decarboxylase cloned in lambda gt-11: fusion protein produces gamma-aminobutyric acid.** *Science*, 232(4754): 1138-40, 1986.

KANAANI, J.; LISSIN, D.; KASH, S.F.; BAEKKESKOV, S. **The hydrophilic isoform of glutamate decarboxylase, GAD67, is target to membranes and nerve terminals independent of dimerization with the hydrophobic membrane-anchored isoform GAD65.** *J. Biol. Chem.*, 274: 37200-37209, 1999.

KANDLER, K.; KATZS, L.C. **Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction mediated biochemical communication.** *J. Neurosci.*, 18: 1419-1427, 1998.

KATO, M., DOBYNS, W.B. **Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration.** *Hum. Mol. Genet.*, 12 (Spec No 1): R89-96, 2003.

KAUFMAN, D.L.; MCGINNIS, J.F.; KRIEGER, N.R.; TOBIN, A.J. **Brain glutamate decarboxylase cloned in lambda gt-11: fusion protein produces gamma-aminobutyric acid.** *Science*, 232(4754): 1138-40, 1986.

KAWAGUCHI, Y.; KUBOTA, Y. **GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex.** *Cereb Cortex*, 7(6): 476-86, 1997.

KOLB, J.E.; TRETTEL, J.; LEVINE, E.S. **BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol.** *Synapse*, 55(1): 52-7, 2005.

KOMURO, H.; KUMADA, T. **Ca²⁺ transients control CNS neuronal migration.** *Cell Calcium*, 37(5): 387-93, 2005.

KOMURO, H.; RAKIC, P. **Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, intracellular Ca²⁺ fluctuations.** *J. Neurobiol.*, 37: 110-130, 1998.

KOMURO, H.; RAKIC, P. **Modulation of neuronal migration by NMDA receptors.** *Science*, 260: 95-97, 1993.

KOMURO, H.; RAKIC, P. **Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration.** *Science*, 257(5071): 806-9, 1992.

KOMURO, H.; RAKIC, P. **Modulation of neuronal migration by NMDA receptors.** *Science*, 260(5104): 95-7, 1993.

KORPI, E.R.; DEBUS, F.; LINDEN, A.; MALECOT, C.; LEPPA, A.; VEKOVISCHEVA, O.; RABE, H.; BÉOHME, I.; ALLER, M.I.; WISDEN, W.; LUDDENS, H. **Does ethanol act preferentially via selected brain GABA_A receptor subtypes? The current evidence is ambiguous.** *Alcohol*, 41: 163-176, 2007.

KUMADA, T.; JIANG, Y.; CAMERON, D.B.; KOMURO, H. **How does alcohol impair neuronal migration?** *J. Neuroscience Res.*, 85: 465-470, 2007.

KUMADA, T.; KOMURO, H. **Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca(2+) transients.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(22): 8479-84, 2004.

KUMADA, T.; LAKSHMANA, M.K.; KOMURO H. **Reversal of neuronal migration in a mouse model of fetal alcohol syndrome by controlling second-messenger signalings.** *J. Neurosci.*, 26(3): 742-56, 2006.

KUMADA, T.; JIANG, Y.; CAMERON, D.B.; KOMURO, H. **How does alcohol impair neuronal migration?** *J. Neurosci Res.*, 85(3): 465-70, 2007.

LARROQUE, B. **Alcohol and the fetus.** *J. Epidemiol.*, 21(4): S58-96, 1992.

LAVDAS, A.A.; GRIGORIU, 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): 7881-7888, 1999.

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

LEVI-MONTALCINI, R. **The nerve growth factor 35 years later.** *Science*. 237(4819): 1154-62, 1987.

LEVITT, P. **Prenatal effects of drugs of abuse on brain development.** *Drug Alcohol Depend.*, 51(1-2): 109-25, 1998.

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

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.

LIMA, J.P.M. **Efeitos da exposição pré-natal ao etanol sobre a proliferação e morte celular nas eminências ganglionares.** *Tese de Mestrado – UFRJ*, 85 páginas, 2008.

LINDVALL, O.; BJÖRKLUND, A. **Intracerebral grafting of inhibitory neurons. A new strategy for seizure suppression in the central nervous system.** *Adv. Neurol.*, 57: 561-9, 1992.

LIVY, D.J.; MILLER, E.K.; MAIER, S.E.; WEST, J.R. **Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus.** *Neurotoxicol. and Teratol.*, 25: 447–458, 2003.

LO TURCO J.J.; OWENS, D.F.; HEATH, M.J.; DAVIS, M.B.; KRIEGSTEIN, A.R. **GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis.** *Neuron.*, 15: 1287–1298, 1995.

LO TURCO, J.J.; BLANTON, M.G.; KRIEGSTEIN, A.R. **Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development.** *J. Neurosci.*, 11: 792–799, 1991.

LOPEZ-BENDITO, G.; STURGESS, K.; ERDELYI, F.; SZABO, G.; MOLNAR, Z.; PAULSEN, O. **Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons.** *Cereb. Cortex*, 14: 1122-1133, 2004.

LÓPEZ-BENDITO, G.; LUJÁN, R.; SHIGEMOTO, R.; GANTER, P.; PAULSEN, O.; MOLNÁR, Z. **Blockade of GABA_B Receptors alters the tangential migration of cortical neurons.** *Cereb. Cortex.*, 13(9): 932-42, 2003.

LOPEZ-MENDEZ, G.; LUJAN, R.; SHIGEMOTO, R.; GRANER, P.; PAULSEN, O.; MOLNAR, Z.; BLOCKADE, O.F.; **Gaba (b) receptors alters the tangential migration of cortical neurons.** *Cereb., cortex*, 13: 932-942, 2003.

LÖSCHER, W.; EBERT, U.; LEHMANN, H.; ROSENTHAL, C.; NIKKHAH, G. **Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra.** *J. Neurosci. Res.*, 51(2): 196-209, 1998.

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

LOTURCO, J.J.; BLANTON. M.G.; KRIEGSTEIN, A.R. **Initial expression and endogenous activation of NMDA channel in early neocortical development.** *J. Neurosci.*, 11: 792-799, 1991.

LOTURCO, J.J.; OWENS, D.F.; HEATH, M.J.; DAVIS, M.B.; KRIEGSTEIN, A.R. **GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis.** *Neuron.*, 15: 1287-1298, 1995.

LOVINGER, D.M.; WHITE, G.; WEIGHT, F.F. **Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons.** *Science*, 243: 1721-1724, 1989.

LUJAN, R.; SHIGEMOTO, R.; LOPEZ-BENDITO, G. **Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain.** *Neuroscience*, 130(3): 567-80, 2005.

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.

MANENT, J.B. ; DEMARQUE, M. ; JORQUERA, I.; PELLEGRINO, C.; BEN-ARI, Y.; ANIKZTE, J.N.; REPRESA, A. **A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration.** *J. Neurosci.*, 26: 4775-4765, 2005.

MANENT, J.B.; JORQUERA, I. BEN-ARI, ANIKZTE, J.N.; REPRESA, A. **A. Glutamate acting on ANPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons.** *J.Neurosci.*, 26: 5901-5909, 2006.

MARCUS, J.C. **Neurological findings in the fetal alcohol syndrome.** *Neuropediatrics*, 3: 158-60, 1987.

MARIC, D.; LIU, Q.Y.; MARIC, I.; CHAUDRY, S.; CHANG, Y.H.; SMITH, S.V.; SIEGHART, W.; FRITSCHY, J.M.; BARKER, J.L. **GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels.** *J. Neurosci.*, 21(7): 2343-60, 2001.

MARÍN, O.; YARON, A.; BAGRI, A.; TESSIER-LAVIGNE, M.; RUBEINSTEIN, J.L. **Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin/neuropilin interactions.** *Science*, 293: 872-75, 2001.

MARIN, O.; ANDERSON, S.A.; RUBENSTEIN, J.L. **Origin and molecular specification of striatal interneurons.** *J. Neurosci.*, 20(16): 6063-76, 2000.

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

MARÍN, O.; RUBENSTEIN, J.L. **Cell migration in the forebrain.** *Annu. Rev. Neurosci.*, 26: 441-83, 2003.

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

MARKRAM, H.; TOLEDO-RODRIGUEZ, M.; WANG, Y.; GUPTA, A.; SILBERBERG, G.; WU, C. **Interneurons of the neocortical inhibitory system.** *Nat. Rev. Neurosci.*, (10): 793-807, 2004.

MARTIN, D.L.; RIMVALL, K. **Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain.** *J. Neurochem.*, 60(2): 395-407, 1993.

MARTIN, L.J. **Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury.** *Int. J. Mol. Med.*, 5: 455-78, 2001.

MARTY, S.; CAROLL, P.; CASTREN, E.; STAINER, V.; THOENEN, H.; LINDHOLM, D. **Brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of various hippocampal nonpyramidal neurons, including Cajal-Retzius cells, in organotypic slice cultures.** *J. Neurosci.*, 16: 675-687, 1996.

MATTSON, S.N.; RILEY, E.P.; GRAMLING, L.; DELIS, D.C.; JONES, K.L. **Heavy prenatal alcohol exposure with or without physical features of fetal alcohol syndrome leads to IQ deficits.** *J. Pediatrics*, 131(5): 718-721, 1997.

MCGOVERN; PATRICK, E. **The Origins and Ancient History of Wine.** Disponível em: http://www.museum.upenn.edu/new/exhibits/online_exhibits/wine/win_eintro.html. Acesso em: 17 nov. 2007.

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

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

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.; NOWAKOWSKI, R.S. **Effects of prenatal 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.; POTEPA, G. **Numbers of neurons and glia in mature rat somatosensory cortex: effects of prenatal exposure to ethanol.** *J. Comp. Neurol.*, 293(1): 92-102, 1990.

MILLER, M.W.; ROBERTSON, S. **Prenatal 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.

MILLER, M.W. **Effect of prenatal exposure to alcohol on the distribution and time of origin of corticospinal neurons in the rat.** *J. Comp. Neurol.*, 257(3): 372-82, 1987.

MILLER, M.W. **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.; JACOBS, J.S.; YOKOYAMA, R. **Neg, a nerve growth factor-stimulated gene expressed by fetal neocortical neurons that is downregulated by ethanol.** *J. Comp. Neurol.*, 460(2): 212-22, 2003.

MILLER, M.W.; ROBERTSON, S. **Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex.** *J. Comp. Neurol.*, 337(2): 253-66, 1993.

MILLER, S.I.; DEL VILLANO, B.C.; FLYNN, A.; KRUMHANSI, M. **Interaction of alcohol and zinc in fetal dysmorphogenesis.** *Pharm. Biochem. Behavior.*, 311-5, 1983.

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.

MOHRMANN, R.; WERNER, M.; HATT, H.; GOTTMANN, K.; **Target-specific factors regulate the formation of glutamatergic transmitter release sites in cultured neocortical neurons.** *J. Neurosci.*, 19(22): 1004-10013, 1999.

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

MOONEY, S.M.; MILLER, M.W. **Ethanol-induced neuronal death in organotypic cultures of rat cerebral cortex.** *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 147(1-2): 135-41, 2003.

MOONEY, S.M.; SIEGENTHALER, J.A.; MILLER, M.W. **Ethanol induces heterotopias in organotypic cultures of rat cerebral cortex.** *Cerebral Cortex*, 14(10): 1071-1080, 2004.

MOTOYAMA, N.; WANG, F.; ROTH, K.A.; SAWA, H.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, K.; NEGISHI, I.; SENJU, S.; ZHANG, Q.; FUJII, S. **Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice.** *Science*, 267(5203): 1506-10, 1995.

NAGY, J.; MULLER, F.; LASZLO, L. **Cytotoxic effect of alcohol-withdrawal on primary cultures of cortical neurons.** *Drug Alcohol Depend.*, 61(2): 155-62, 2001.

OBATA, K.; OIDE, M.; TANAKA, H. **Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture.** *Brain Res.*, 144(1): 179-84, 1978.

OBERNIER, J.A.; BOULDIN, T.W.; CREWS, F.T. **Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death.** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 26(4): 547-57, 2002.

OBERNIER, J.A.; WHITE, A.M.; SWARTZWELDER, H.S.; CREWS, F.T. **Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats.** *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 72(3): 521-32, 2002.

OLNEY, J.W.; ISHIMARU, M.J.; BITTIGAU, P.; IKONOMIDOU, C.; **Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain.** *Apoptosis*, 6: 515-21, 2000.

OLNEY, J.W.; TENKOVA, T.; DIKRANIAN, K.; QIN, Y.Q.; LABRUYERE, J.; IKONOMIDOU, C. **Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain.** *Brain Res. Dev. Brain. Res.*, 133(2): 115-26, 2002.

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

OWENS, D.F.; KRIEGSTEIN, A.R. **Is there more to GABA than synaptic inhibition?** *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 715-727, 2002.

OWENS, D.F.; LIU, X.; KRIEGSTEIN, A.R. **Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development.** *J. Neurophysiol.*, 82: 570-583, 1999.

OWENS, D.F.; LIU, X.; KRIEGSTEIN, A.R. **Changing properties of GABA(A) receptor-mediated signaling during early neocortical development.** *J. Neurophysiol.*, 82(2): 570-83, 1999.

OZER, E.; SARIOGLU, S.; GURE, A. **Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain.** *Clin. Neuropathol.*, 19(1): 21-5, 2000.

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

PEINADO, A.; YSTE, R.; KATZ, L.C. **Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit.** *Neuron*, 10: 103-114, 1993.

PILZ, D.; STOODLEY, N.; GOLDEN, J.A. **Neuronal migration, cerebral cortical development, and cerebral cortical anomalies.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1: 1-11, 2002.

PLA, R.; BORRELL, V.; FLAMES, N.; MARÍN, O. **Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling.** *J. Neurosci.*, 26(26): 6924-34, 2006.

PLATEL, J.C.; BOSSEAU, S.; DUPUIS, A.; BROCARD, J.; POUPARD, A.; SAVASTA, M.; VILLAZ, M.; ALBRIEUX, M. **Na⁺ channel-mediated Ca²⁺ entry leads to glutamate secretion in mouse neocortical preplate.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 19174-19179, 2005.

PLEASURE, S.J.; ANDERSON, S.; HEVNER, R.; BAGRI, A.; MARIN, O.; LOWENSTEIN, D.H.; RUBENSTEIN, J.L. **Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons.** *Neuron*, 3: 727-40, 2000.

PODKLETNOVA, I.; MAKELA, R.; KORPI, E.R.; LUDDENS, H.; HELEN, P.; ALHO, H. **Neonatal 6-hydroxydopamine treatment affects GABA(A) receptor subunit expression frontal cortex but not the hippocampus of rats during postnatal development.** *Dev. Neurosci.*, 22(4): 296-302, 2000.

POLLEUX, F.; WHITFORD, K.L.; DIJKHUIZEN, P.A.; VITALIS, T.; GHOSH, A. **Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling.** *Development*, 129(13): 3147-60, 2002.

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.

POZAS, E; IBÁÑEZ, C.F. **GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons.** *Neuron*, 45(5): 701-13, 2005.

PURCELL, N. **Diet, Community, And History At Rome.** *American Journal of Philology*. 124.: 329-358,2003. Disponível em: <http://www.press.jhu.edu/journals/american_journal_of_philology/> Acesso em: jan. 2008.

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

REHEN, S.K.; NEVES D.D.; FRAGEL-MADEIRA, L.; BRITTO, L.R.; LINDEN, R. **Selective sensitivity of early postmitotic retinal cells to apoptosis induced by inhibition of protein synthesis.** *Eur. J. Neurosci.*, 12: 4349-56, 1999.

RICKMANN, M.; CHRONWALL, B.M.; WOLFF, JR. **On the development of non-pyramidal neurons and axons outside the cortical plate: the early marginal zone as a pallial anlage.** *Anat. Embryol.* 151(3): 285-307, 1977.

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 prenatally exposed to alcohol.** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 19: 1198-1202, 1995.

ROZENBERG, F.; ROBAIN, O.; JARDIN, L.; BEN-ARI, Y. **Distribution of GABAergic neurons in late fetal and early postnatal rat hippocampus.** *Dev. Brain Res.*, 50: 177-187, 1989.

ROZENBERG, F.; ROBAIN, O.; JARDIN, L.; BEN-ARI, Y. **Distribution of GABAergic neurons in late fetal and early postnatal rat hippocampus.** *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 50(2): 177-87, 1989.

RUTLEDGE, L.T.; SUTTER, M.A.; CHI, S.I.; GRAY, T.A. **Effects of chronic ethanol treatment on neocortex.** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 10(5): 512-6, 1986.

RYMAR, V.V.; SADIKOT, A.F. **Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype.** *J. Comp. Neurol.*, 501(3): 369-80, 2007.

SANABRIA, E.R.; SILVA, A.V.; SPREAFICO, R.; CAVALHEIRO, E.A. **Damage, reorganization, and abnormal neocortical hyperexcitability in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.** *Epilepsia*, 43(Suppl. 5): 96-106, 2002.

SARI, Y.; ZHOU F.C. **Prenatal alcohol exposure causes long-term serotonin neuron deficit in mice.** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 28(6): 941-8, 2004.

SCHANUEL, S. **Expressão de Condroitim Sulfato no Telencéfalo de Embriões de Camundongo: Possível Relação com o Trajeto Migratório dos Precusores GABAérgicos Neocorticais.** *Tese de Mestrado – UFRJ*, 72 páginas, 2004.

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.

SHEIKH, S.N.; MARTIN, D.L. **Heteromers of glutamate decarboxylase isoforms occur in rat cerebellum.** *J. Neurochem.*, 66: 2082-2090, 1996.

SHU; TIANZHI; AYALA; RAMSES; NGUYEN; MINH-DANG; XIE; ZHIGANG; GLEENSON, G.; JOSEPH; TSAI LI-HUEI. **Ndel1 Operates in a Common Pathway with LIS1 and Cytoplasmic Dynein to Regulate Cortical Neuronal Positioning.** *Neuron*, 44: 263-277, 2004.

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.

SILVA, A.V.; SANABRIA, E.R.G.; CAVALHEIRO, E.A.; SPREAFICO, R. **Alterations of the neocortical GABAergic system in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Neuronal damage and immunocytochemical changes in chronic epileptic rats.** *Brain Res. Bulletin*, 58(4): 417-21, 2002.

SOKOL, R.J.; DELANEY-BLACK, V.; NORDSTROM, B.; **Fetal alcohol spectrum disorder.** *JAMA*, 290(22): 2996-9, 2003.

SORIA, J.M.; VALDEOLMILLOS, M.; **Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells cerebral cortex.** *Cereb. Cortex*, 12(8): 831-9, 2002.

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 prenatal 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 prenatally exposed to alcohol.** *Cognit. Neurosci. Neuropsychol.*, 12: 515-523, 2001b.

TAKEDA, A.; HIRATE, M.; TAMANO, H.; OKU, N. **Release of glutamate and GABA in the hippocampus under zinc deficiency.** *J. Neurosci. Res.*, 72(4): 537-42, 2003.

TAMAMAKI, N.; FUJIMORI, K.E.; TAKAUIJI, R. **Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone.** *J. Neurosci.*, 17(21): 8313-23, 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): 5803-13, 2003.

TANAKA, D.H.; MAEKAWA, K.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K.; MURAKAMI, F. **Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex.** *Development*, 133(11): 2167-76, 2006.

TAPIA, J.C.; MENTIS, G.Z.; NAVARRETE, R.; NUALART, F.; FIGUEROA E.; SÁNCHEZ, A.; AGUAYO, L.G. **Early expression of glycine and GABA(A) receptors in developing spinal cord neurons. Effects on neurite outgrowth.** *Neurosci.*, 108(3): 493-506, 2001.

TAYLOR, J.; DOCHERTY, M.; GORDON-WEEKS, P.R. **GABAergic growth cones: release of endogenous γ -aminobutyric acid precedes the expression of synaptic vesicle antigens.** *J. Neurochem.*, 54(5): 1689-99, 1990.

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.

THOMPSON, K.W.; SUCHOMELOVA, L.M. **Transplants of cells engineered to produce GABA suppress spontaneous seizures.** *Epilepsia*, 45(1): 4-12, 2004.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; MELLO, L.M.; SCHWARZ, M. TURSKI, L. **Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis.** *Brain Res.*, 321(2): 237-53, 1984.

VAILLANT, G.E. **The natural history of alcoholism** - *Harvard University Press, USA*, 1983.

VALCANIS, H.; TAN, S.S. **Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex.** *J. Neurosci.*, 23(12): 5113-22, 2003.

VARJU, P.; KARATOVA, Z.; MADARASZ, E.; SZABO, G. **GABA signalling during development: new data and old questions.** *Cell Tissue Res.*, 305(2): 239-46, 2001a.

VARJU, P.; SCHLETT, K.; EISEL, U; MADARASZ, E.; **Schedule of NMDA receptor subunit expression and functional channel formation in the course of *in vitro*-induced neurogenesis.** *J. Neurochem.*, 77(6): 1444-56, 2001b.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C. **Histoire de l'alcool archéologie partie 1.** *Viala-Artigues*, 2003. Disponível em: <http://www.alcoologie.org/documentation/article.php3?id_article=118> Acesso em jan. 2008.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C **Histoire de l'alcool les temps modernes partie 1**,2003.Disponivelem<http://www.alcoologie.org/documentation/article.php3?id_article=120> Acesso em jan. 2008.

VIALA-ARTIGUES, J.; MECHETTI, C. **Histoire de l'alcool les temps modernes partie 2** 2003. Disponível em <http://www.alcoologie.org/documentation/article.php3?id_article=121> Acesso em jan. 2008.

WALTER, H.J.; MESSING, R.O. **Regulation of neuronal voltage-gated calcium channels by ethanol.** *Neurochem. Int.*, 35(2): 95-101, 1999.

WEINER, J.A.; CHUN, J. **Png-1, a nervous system-specific zinc finger gene, identifies regions containing postmitotic neurons during mammalian embryonic development.** *J. Comp. Neurol.* 381(2): 130-42, 1997.

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.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; HERRERA, D.G.; ALVAREZ-BUYLLA, A. **Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain.** *Nat. Neurosci.*, 5: 461-6, 1999.

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.

WICHTERLE, H.; ALVAREZ-DOLADO, M.; ERSKINE, L.; ALVAREZ-BUYLLA, A. **Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(2): 727-32, 2003.

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: 3759-71, 2001.

WYLLIE, A.H.; MORRIS, R.G.; SMITH, A.L.; DUNLOP, D. **Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis.** *J. Pathol.*, 142(1): 67-77, 1984.

XU, Q.; COBOS, I.; DE LA CRUZ, E.; RUBENSTEIN, J.L.; ANDERSON, S.A. **Origins of cortical interneuron subtypes.** *J. Neurosci.*, 24(11): 2612-2622, 2004.

YABUT, O.; RENFRO, A.; NIU, S.; SWANN, J.W.; MARÍN, O.; D'ARCANGELO, G. **Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain.** *Brain Res.*, 1140: 75-83, 2007.

YAN, X.X.; RIBAK C.E. **Developmental expression of gamma-amino-butyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells.** *Brain Res.*, 111: 253-269, 1998.

YAU, H.J.; WANG, H.F.; LAI, C.; LIU, F.C. **Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences.** *Cereb. Cortex.*, 3: 252-64, 2003.

YOZU, M.; TABATA, H.; NAKAJIMA, K. **Birth-date dependent alignment of GABAergic neurons in the developing mouse visual cortex.** *Neurosci. Res.*, 49: 395-403, 2004.

YUSTE, R.; PEINADO, A.; KATZ, L.C. **Neuronal domains in developing neocortex.** *Science*, 257: 665-669, 1992.

ZHU, Y.; LI, H.; ZHOU, L.; WU, J.Y.; RAO, Y. **Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex.** *Neuron*, 23: 473-485, 1999.

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](#)