



ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DO CEREBELO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AGUDA AO ETANOL NO 12º DIA DE VIDA INTRAUTERINA

Imunohistochemical study of the cerebellum in Wistar rats submitted to acute prenatal exposure to ethanol at the 12th day of intrauterine life

Aline G. Souza¹; Humberto G. Rodrigues¹; Clarissa M. Serpa-Vieira¹; Marcus V. C. Mateus¹; Tales A. Aversi-Ferreira^{1*}.

Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Morfologia
Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia
74001-970 Goiânia-GO Brasil

* Autor para correspondência _ e-mail: aversiferreira@yahoo.com.br

Recebido em 10/01/2006 - Aceito em 04/07/2006

RESUMO: Os efeitos do uso crônico de etanol durante a gravidez sobre a morfologia e as funções do sistema neural são conhecidos na literatura, mas os efeitos do uso agudo de etanol em momentos críticos da gravidez ainda precisam ser esclarecidos. A exposição pré-natal crônica ao etanol tem sido associada a várias anormalidades em fetos e neonatos, como alterações na densidade neuronal de células piriformes do cerebelo também chamadas de células de Purkinje. Neste trabalho nós estudamos os efeitos da utilização aguda de etanol no décimo segundo dia de gestação (E₁₂), sobre a morfologia do cerebelo da prole. Não houve diminuição nos precursores das células granulares e de Purkinje, como ocorrido na síndrome alcoólica fetal produzida pela exposição crônica de ratas prenhas ao etanol. Isso pode ser explicado pelo fato de que os animais foram expostos ao etanol após o nascimento das células de Purkinje, e estas constituem um importante fator para migração e sobrevivência das células granulares. Os efeitos agudos do etanol no período em que se inicia a construção cortical cerebral, têm demonstrado alto grau de severidade sobre este tecido, mas fora dessa data, não foram observados, nas condições deste trabalho, os mesmos efeitos deletérios observados no córtex cerebral sobre o córtex cerebelar.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicidade aguda, cerebelo, etanol, síndrome alcoólica fetal, neurônio.

ABSTRACT: The effects of the chronic use of ethanol during pregnancy on the morphology and function of the neural system are known in literature, but the effects of the acute use of ethanol at critical moments of pregnancy still need to be clarified. The chronic prenatal exposure to ethanol have been associated to several anomalies in fetus and new-born rats, as alterations in the neuronal density of the piriform cells of the cerebellum, as known as Purkinje cells. In this paper, we have studied the effects of the acute exposure to ethanol at the 12th day of pregnancy of Wistar female rats on the morphology of the cerebellum in the brood. There was no decrease in the granular precursors and Purkinje cells, as occurred in the fetal alcoholic syndrome produced by the chronic exposure of pregnant rats to ethanol, which could be explained by the fact that the ethanol exposure happened after borning of the Purkinje cells, which constituted an adequate media to migration and surviving of the granular cells. The ethanol's acute effects in begin of the cerebral cortical construction, demonstrate high severity on this tissue, but no in this date, can't be observed, in this work, the same deleterious effects seen on cerebral cortex in cerebelar cortex.

KEYWORDS: Acute toxicity, cerebellum, ethanol, fetal alcoholic syndrome, neuron.

INTRODUÇÃO

O cerebelo é uma estrutura cortical cheia de convoluções, situado na fossa craniana posterior dorsalmente ao bulbo e à ponte (VOOGD & GLICKSTEIN, 1998).

Ele é um modulador e regulador da função motora do organismo. Os principais sinais de disfunção cerebelar incluem instabilidade postural (vestibulocerebelo), falta de controle motor durante a execução de atividades motoras (espinocerebelo) e perda do sincronismo e do planejamento apropriado das ações motoras (cerebrocerebelo). Essas disfunções podem ocorrer separadamente ou combinadas, refletindo a região ou regiões específicas do cérebro afetadas (BARCO, ENGEBY & RIBAL, 2001).

O córtex cerebelar de mamíferos, incluindo humanos, possui uma citoarquitetura caracterizada por três camadas: a camada molecular, a camada das células de Purkinje e a camada granular (VOOGD, 2003). O cerebelo é alvo de muitos estudos devido à regularidade de seus neurônios, sua organização e seus circuitos (PALKOVITS, MAGYAR & SZENTÁGOTHAÍ, 1971; BRAVIN et al., 1999).

A camada molecular contém células estreladas localizadas superficialmente e dendritos de células de Purkinje. A camada de células de Purkinje contém células em forma de cesto, chamadas de células piriformes do cerebelo ou células de Purkinje, que ocorrem exclusivamente no cerebelo.

As células de Purkinje são os elementos dominantes no processamento da informação cerebelar (APFEL et al., 2002) e são os únicos neurônios que enviam seus axônios para fora do córtex cerebelar (HIRANO, KUBO & WU, 1986) e utilizam o GABA como neurotransmissor (SANNA et al., 2004).

A camada granular contém pequenas células granulares e glomérulos em ratos adultos. Os neurônios granulares correspondem a aproximadamente 95% das células do cerebelo maduro. A migração celular no cerebelo é orientada verticalmente por fibras gliais de Bergmann ao longo da camada molecular (ECCLES, 1970; KRYSOSEK & SEEDS, 1981), onde estão localizados os precursores das células granulares.

O córtex cerebelar é compartimentado em uma série de agrupamentos bilaterais simétricos ao longo do eixo mediolateral (M-L) (VOOGD & GLICKSTEIN, 1998; HASHIMOTO & MIKOSHIBA, 2003) durante a embriogênese.

As células de Purkinje são geradas em torno de E_{10} e $E_{12,5}$ a partir de células progenitoras localizadas na parede do quarto ventrículo. No entanto, as células que nasceram em $E_{11,5}$ e E_{12} não contribuem para a formação de agrupamentos M-L (HASHIMOTO & MIKOSHIBA, 2003).

As exposições crônicas à solução aquosa de etanol, nas concentrações de 4,12 e 24% causam alterações morfológicas no corpo celular das células de Purkinje (APFEL et al., 2002).

Muitos trabalhos estudaram os efeitos crônicos da exposição crônica do etanol em cerebelos de mamíferos (GREEN, 2004; WANG, FREUND & PALMER, 1999), mas apenas poucos trabalhos têm investigado os efeitos agudos do etanol (AVERSI-FERREIRA et al., 2004; AVERSI-FERREIRA & PENHA-SILVA, 2005a, AVERSI-FERREIRA et al., 2005b, AVERSI - FERREIRA et al., 2006; FIÚZA & MORAIS, 2005).

O movimento coordenado de neuroblastos é consequência da associação e dissociação do citoesqueleto (MILLER, 1993), e depende da glia radial para alcançar o seu destino nas camadas do neocórtex. (GELOT, ESPERANDIEU & POMPIDOU, 1998; MAEDA & NODA, 1998; SUPER, SORIANO & UYLINGS, 1998).

Desarranjos causados pelo etanol em eventos de astrogliogênese podem produzir distúrbios na interação neurônio-gliial que contribuiriam para anomalias no sistema olfatório (BARRON & RILEY, 1992; MORROW, KIEFER & METZLER, 1993; CHEN, PARNELL & WEST, 1999).

O etanol causa danos em vários órgãos e particularmente em neurônios adultos e em desenvolvimento (SHETTY, BURROWS & PHILIPS, 1993). Essa destruição está associada ao desarranjo dos elementos contráteis do citoesqueleto em células da crista neural e do músculo cardíaco (MILLER, 1993).

As células de Purkinje são as principais formadoras de sinapses com outras células do córtex cerebelar na camada molecular (KONNERTH, LLANOT & ARMSTRONGT, 1990). O estabelecimento de muitas conexões sinápticas evita apoptose dos neurônios que possuem maior número de conexões, pois essas células são produzidas em excesso em todo o sistema neural (D'MELLO, 1998).

A exposição crônica ao etanol em ratos (SANNA et al., 2004; GREEN, 2004; WANG, FREUND & PALMER, 1999) produz significativa diminuição da densidade de células nas camadas granular, molecular e de Purkinje (GREEN, 2004), pois tais modificações afetam a função motora controlada pelas células de Purkinje, embora esses autores não tenham observado diminuição na densidade das células de Purkinje no córtex cerebelar (MAYER & WEST, 2003).

Os efeitos da exposição aguda de etanol ainda precisam ser explicados, e o objetivo desse estudo foi determinar os efeitos da injeção intraperitoneal de etanol no décimo segundo dia de vida intrauterina (E12), após a origem das células de Purkinje, na densidade neuronal de células cerebelares de ratos no 8º dia de vida pós-natal (P8).

Esse estudo é continuação de outros estudos sobre a ação aguda do etanol em outras regiões do encéfalo de ratos (AVERSI-FERREIRA et al., 2004; AVERSI-FERREIRA & PENHA-SILVA, 2005a, AVERSI-FERREIRA et al., 2005b, AVERSI - FERREIRA et al., 2006). Nestes outros trabalhos os autores verificaram significativas alterações sobre a morfologia do córtex cerebral e do bulbo olfatório em ratos submetidos à exposição aguda ao no 12º dia de gestação de ratas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão Institucional de Ética da Universidade Federal de Uberlândia. Fêmeas de ratos Wistar dos grupos controle e experimental, com pesos corporais variando entre 180 e 230 g, foram engaioladas durante a noite com ratos machos para procriação. A presença de secreções vaginais com espermatozoides foi usada para caracterizar o dia 1 da gestação (E₁). Dezoito fêmeas grávidas de ratos Wistar foram então alojadas em gaiolas mantidas a 22 (± 0,4 °C), com ciclos de luz e escuridão alternados com 12 horas cada, e continuamente abastecidas com alimento e água.

Em E₁₂, doze animais receberam injeções intraperitoneais de solução de etanol a 20% p/v (3 g/kg de peso corporal), por três vezes, com intervalos de 8 horas entre cada administração. Também em E₁₂, seis fêmeas grávidas do grupo controle receberam injeções intraperitoneais de solução salina a 0,9%, também por 3 vezes, com 8 horas de intervalo entre cada administração. Para marcar as células proliferativas, todos os animais receberam uma única injeção intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU) a 5 mg/mL em 0,9% NaCl, com 0,07 mol.L⁻¹ de NaOH, com 60 mg de BrdU por kg de peso corporal, duas horas após a última injeção de etanol ou solução salina.

As 18 ninhadas, num total de 36 filhotes, 2 de cada ninhada, foram numerados e sorteados, sendo 12 derivados das ratas controle, foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), e perfundidos com solução salina e depois com etanol a 70% no oitavo dia de vida pós-natal (P₈). Seus encéfalos foram removidos e processados (MILLER, 1993). Os cérebros foram embebidos em parafina, seccionados no plano sagital em cortes com 7 mm de espessura e montados em lâminas cobertas de gelatina. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em uma série de soluções de etanol, tratados primeiro com NaOH 1N e depois com tampão borato de sódio 1N, durante 20 minutos cada tratamento, e então lavados com tampão fosfato de sódio. Após tratamento com soro, os cortes foram incubados por 2 horas com uma solução 1:500 de anticorpos monoclonais anti-BrdU (Sigma, St. Louis, MO, B-5002), por 1 hora com uma solução 1:200 de anticorpos secundários anti-ratos (Vector, Burlingame, CA, BA-9400), e então tratados com um complexo avidina-biotina (Vector) e com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, MO, D-5637). Os cortes foram cobertos com Entellan. Os cortes dos tecidos de ratos tratados e não tratados também foram corados com hematoxilina e eosina.

As quantidades de células nos grupos controle e tratado foram comparados por análise de variância (ANOVA), com um valor de $p < 0.05$ indicando significância na diferença entre os grupos. A análise estatística foi feita com utilização do programa Origin 6.0 (Microcal Software Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os ratos do grupo controle apresentaram um padrão típico de densidade neuronal no cerebelo, sem heterotopia nem ectopia.

Os ratos tratados que sofreram exposição aguda ao etanol não apresentaram nenhuma mudança significativa na quantidade de neurônios do cerebelo em relação ao grupo controle (fig 1a e b), nas condições deste trabalho.

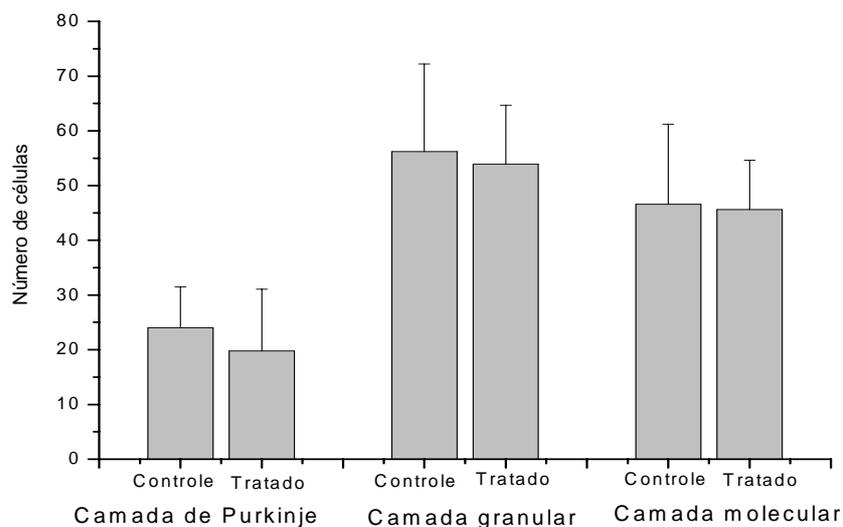


Figura 1a. Número de células, por campo, dos animais tratados e controle nas camadas do cerebelo. As diferenças entre o grupo controle e o grupo experimental não foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

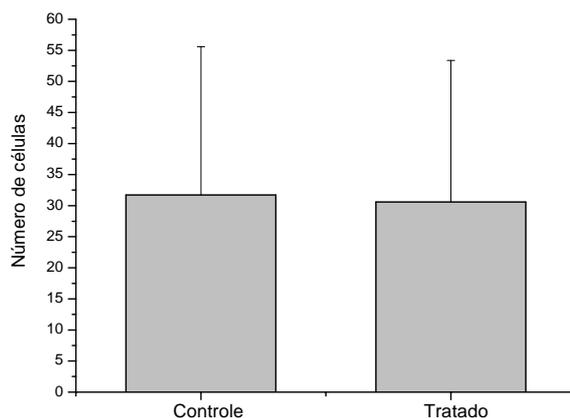


Figura 1b. Número total de células contadas nos animais controle e tratados por campo.

Neurônios de Purkinje não foram observados na camada de Purkinje do cerebelo em ambos, controle e ratos tratados, quando somente foi considerada a marcação com BrdU (Fig 2).

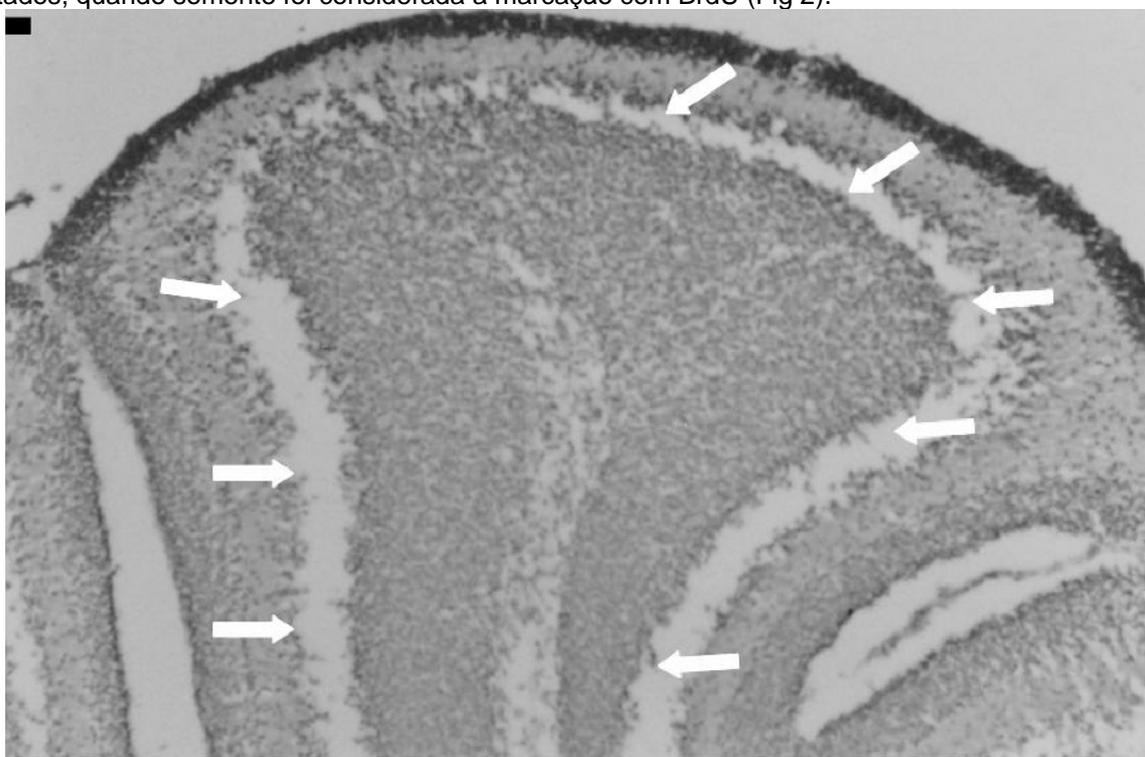


Figura 2. Camadas do cerebelo coradas com BrdU mostrando a presença da camada de Purkinje (setas brancas) sem células visíveis. Barra: 40 μ m.

A BrDU marca células que estão em fase S do ciclo celular, provavelmente as células de Purkinje já tinham sido formadas quando o BrdU foi injetado. A última injeção de etanol ocorreu no fim de E₁₂ e o BrdU foi injetado 2 horas depois, no início de E₁₃, quando as células progenitoras das células de Purkinje já haviam finalizado a fase S. As células de Purkinje são formadas entre E₁₀ e E_{12,5} (HASHIMOTO & MIKOSHIBA, 2003), a grande maioria dessas células provavelmente iniciou sua migração no fim de E₁₂, após a injeção da BrdU.

De fato, quando as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, células de Purkinje foram vistas nessa camada, tanto no cerebelo dos animais controle quanto no cerebelo dos animais tratados (Fig 3).

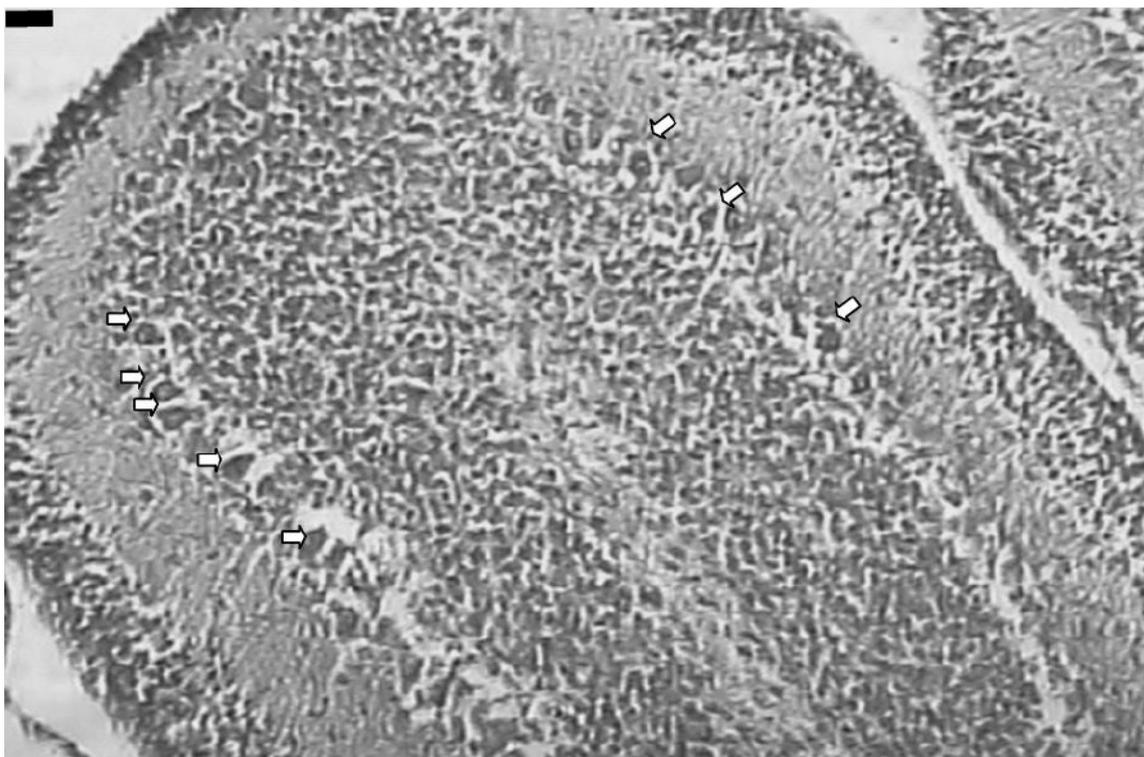


Figura 3. Camadas do cerebello coradas com hematoxilina-eosina apresentando a camada de Purkinje (setas brancas) com células visíveis. Barra: 80 μ m.

A marcação com BrdU é evidente em precursores granulares e células estreladas da camada molecular. Isso indica que a data de nascimento dessas células ocorre por volta de E₁₂.

Nesse trabalho, nas condições de tratamento agudo de etanol, não foram observadas diferenças significativas entre ratos tratados e não tratados nas densidades das células granulares, células estreladas e células de Purkinje do cerebello como demonstrado nas figuras 1a e 1b.

Esses achados não correspondem à hipótese esperada para a ação aguda do etanol sobre o córtex cerebelar como era de se esperar em relação aos estudos da exposição crônica do etanol estudado em diferentes regiões cerebrais (MILLER, 1993; GREEN, 2004), e nem aos estudos da exposição aguda, também em diferentes regiões cerebrais (AVERSI-FERREIRA et al., 2004; AVERSI-FERREIRA & PENHA-SILVA, 2005a, AVERSI-FERREIRA et al., 2005b, AVERSI-FERREIRA et al., 2006), pois, nestes trabalhos últimos trabalhos os autores estudaram os efeitos agudos do etanol sobre neurônios cujas datas de nascimento eram correspondentes ao tempo de exposição ao etanol, o que não ocorreu neste trabalho, pois o etanol foi injetado após o nascimento pré-natal da maioria das células cerebelares. Desse modo duas hipóteses são possíveis sobre esses achados: (1) a injeção aguda de etanol em tempo diferente da data de nascimento do neurônio não tem efeito tão deletério sobre a formação do tecido neural; e (2) o cerebello apresenta, de algum modo, uma proteção contra os efeitos do etanol em relação às outras regiões do tecido cerebral, pois segundo MAYER & WEST (2003) os efeitos crônicos do etanol podem afetar a função motora do cerebello, embora não ocorra diminuição na densidade das células de Purkinje. Desse modo, os dados corroboram a tese de proteção.

No entanto, as duas hipóteses são possíveis de testes posteriores, pois ambas podem ocorrer ao mesmo tempo. Os efeitos agudos do etanol durante a data de nascimento dos neurônios foram comprovados (AVERSI-FERREIRA et al., 2004; AVERSI-FERREIRA & PENHA-SILVA, 2005a, AVERSI-FERREIRA et al., 2005b, AVERSI-FERREIRA et al., 2006) em outras regiões do tecido neural, mas não cerebello segundo as condições deste trabalho.

Outros dados sugerem que o etanol altera a rota normal da migração neuronal (AVERSI-FERREIRA et al., 2004), mas em E₁₂, no cerebello, os precursores granulares e células estreladas já encontraram ambiente tecidual preparado para localizar e estabelecer sinapses, devido à liberação de fatores crescimento pelas células de Purkinje que já migraram para *loci* específicos quando o etanol foi injetado, pois estas as células cerebelares iniciam sua migração em E₁₀ (HASHIMOTO & MIKOSHIBA, 2003).

Outros estudos em épocas diferentes das testadas neste trabalho, associadas com concentrações diferentes de etanol sob condições crônicas e, principalmente, condições agudas, ainda devem ser verificadas. Novos estudos poderão indicar se a toxicidade aguda do etanol está diretamente relacionada com a data de nascimento dos neurônios.

CONCLUSÕES

Os efeitos agudos do etanol no período em que se inicia a construção cortical cerebral, têm demonstrado alto grau de severidade sobre este tecido, mas fora dessa data, não foram observados, nas condições deste trabalho, os mesmos efeitos deletérios observados no córtex cerebral sobre o córtex cerebelar.

REFERÊNCIAS

- APFEL, M.I.R.; ÉSBERAD, C.A.; RODRIGUES, F.K.P.; BAHAMAD, F.M.J.R.; SILLERO, R.O. Estudo estereológico das células de Purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos Wistar. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*. v. 60, n. 2A, p. 258-263, 2002.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; MORAIS, J.O.R.; FERREIRA, N.R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal córtex in wistar rats. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. v. 21, n. 2, p. 97-101, april/june, 2004.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A., PENHA-SILVA, N. Effects of ethanol on the neuronal migration in the brain neocortex formation. *Bioscience Journal*. v. 21, n. 1, p.151-157, jan/april, 2005a.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; CORRÊA, N.C.R; MORAIS, J.O.R; PENHA-SILVA, N. Posnatal effects of ethanol on neocortical neurogenesis in Wistar rats. *Neurociências*. v. 2, n. 6, p. 1-7, nov/dez, 2005b.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.A.; RODRIGUES, H.G.; NERES, A.C.; FONSECA, L.C.;PENHA-SILVA, N. Imunohistoquímica do bulbo olfatório de ratos Wistar, submetidos à exposição aguda com etanol. *Bioscience Journal*. v. 22, n. 1, april, 2006.
- BARCO, A. N.; ENGBY, T. W.; RIBAL, J.B. Cerebelo y procesos cognitivos. *Anales de Psicología*. v. 20, p. 205-221, dec, 2001.
- BARRON, S.; RILEY, E.P. The effects of prenatal alcohol exposure on behavioral and neuroanatomical components of olfaction . *Neurotoxicology and teratology*. v. 14, n. 4, p. 291-297, jul/aug, 1992.
- BRAVIN, M.; MORANDO, L.; VERCELLI, A.; ROSSI, F.;STRATA, P. Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ*.v. 96, n. 4, p. 1704-1709, feb, 1999.
- CHEN, W.J.; PARNELL, S.E.; WEST, J.R. Effects of alcohol and nicotine on developing olfactory bulb: loss of mitral cells and alterations in neurotransmitter levels. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. v. 23, n. 1, p. 18-25, jan, 1999.
- D'MELLO, S.R. Molecular regulation of neuronal apoptosis. *Current Topics in Developmental Biology*. v. 39, p. 187-213, 1998.
- ECCLES, J.C. Neurogenesis and Morphogenesis in the Cerebellar Cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 66, n. 2, p. 294-301, jun, 1970.
- FIUZA, T.S.; MORAIS, J.O.R. Immunohistochemical evaluation of the postnatal effects of acute exposure to ethanol on the kinetics of granule-cell migration in rat cerebellum. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. v. 22, n.1, p. 19-24, 2005.
- GELOT, A.; ESPERANDIEU, O.; POMPIDOU, A. (1998). Histogenesis of the corpus callosum. *Neurochirurgie*. v. 44, n. 1, p. 61-73, may, 1998.
- GREEN, J.T. The effects of ethanol on the developing cerebellum and eyeblink classical conditioning. *Cerebellum*. v. 3, n. 3, p. 178-187, sep, 2004.
- HASHIMOTO, M.; Mikoshiba, K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the "Birth Date" of Purkinje cells. *The Journal of Neuroscience*. v. 23, n. 36, p. 11342–11351, dec, 2003.
- HIRANO, T.; KUBO, Y.; WU M.M. (1986). Cerebellar granule cells in culture: Monosynaptic connections with Purkinje cells and ionic currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 83, n. 13, p. 4957-4961, jul, 1986.

KONNERTH, A.; LLANOT, I.; ARMSTRONGT, C.M. Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 87, n. 7, p. 2662-2665, april, 1990

KRYSTOSEK, A.; SEEDS, N.W. Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 78, n. 12, p. 7810-7814, dec, 1981.

MAEDA, N.; NODA, M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTP beta and its ligand pleotrophin/heparin-binding growth associated molecule (HB-Gan) in neuronal migration. The Journal of Cell Biology, v. 142, n. 1, p. 203-216, jul, 1998.

MAYER, S.E.; WEST, J.R. Alcohol and nutritional control treatments during neurogenesis in rat brain reduce total neuron number in locus coeruleus, but not in cerebellum or inferior olive. Alcohol. v. 30, n.1, p. 67-74, 2003.

MILLER, M.W. Migration of cortical Neurons is altered by gestation exposure to ethanol. Alcoholism, Clinical and Experimental Research. v. 17, n. 2, p. 304-314, april, 1993.

MORROW, N.S.; KIEFER, S.W.; METZLER, C.W. Gustatory and olfactory contributions to alcohol consumption in rats. Alcohol. v. 10, n. 4, p. 263-267, jul/aug, 1993

PALKOVITS, M.; MAGYAR P.; SZENTÁGOTHAJ, J. Quantitative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. II. Cell numbers and densities in the granular layer. Brain Research.v. 32, n. 1, p. 15-30, sep, 1971.

SANNA, A.; CONGEDDU, E.; SABA, L.; PORCELLA, A.; MARCHESE, G.; RUIU, S.; CASTI, P.; SABA, P.; PANI, L. The cerebellar GABAA alpha6 subunit is differentially modulated by chronic ethanol exposure in normal (R100R) and mutated (Q100Q) sNP rats. Brain Research. v. 998, n. 2, p. 148-54, feb, 2004.

SHETTY, A.K.; BURROWS, R.C.; PHILIPS, D.E. Alterations in neuronal development in the substantia nigra pars compacta following in utero ethanol exposure immunohistochemical and Golgi studies. Neuroscience. v. 52, n. 2, p.311-322, jan, 1993.

SUPER, H.; SORIANO, E.; UYLINGS, H.B. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. Brain Research. v. 27, n. 1, p. 40-64, jun, 1998.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.S.; CAVINESS, J.R. VS . Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. v. 16, n.18, p. 5762-5776, sep, 1996.

VOOGD, J.; GLICKSTEIN M. The anatomy of the cerebellum. Trends in Neurosciences. v. 21, n. 9, p. 370-375, sep, 1998.

VOOGD, J. The human cerebellum. Journal of Chemical Neuroanatomy. v. 26, n. 4 , p. 243-252, dec, 2003.

WANG, Y.; FREUND, R.K.; PALMER, M.R. Potentiation of ethanol effects in cerebellum by activation of endogenous noradrenergic inputs. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics .v. 288, n. 1, p. 211-220, jan, 1999.