



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

MARA APARECIDA PEREIRA DE ÁVILA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DA PROLE

ALFENAS- MG

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

MARA APARECIDA PEREIRA DE ÁVILA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DA PROLE

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL- MG.

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

ALFENAS- MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Ávila, Mara Aparecida Pereira de.

Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento e comportamento da prole / Mara Aparecida Pereira de Ávila. -- Alfenas - MG, 2017.

147 f.

Orientador: Alexandre Giusti Paiva

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Etanol. 2. Gravidez. 3. Comportamento do Adolescente.
4. Transtornos de Adaptação. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD-618.24

MARA APARECIDA PEREIRA DE ÁVILA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DA PROLE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em: 5/4/2017

Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dra. Daniele Cristina de Aguiar

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura:

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dr. Wagner Luis Reis

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura:

Prof. Dra. Fernanda de Carvalho Vidigal

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Os primeiros passos de nossas vidas são amparados por nossos pais e os passos seguintes por seus ensinamentos. Dedico esta tese àqueles que sempre se dedicaram a mim: meus pais Zélia e Antônio.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho, para mim, representa mais que uma formação acadêmica, pois reflete a concretização de um grande sonho! É imensamente importante enfatizar que jamais seria capaz de realizá-lo sozinha, e agora é tempo de agradecer aos coautores que participaram de sua conclusão.

Primeiramente, agradeço à Deus, sem O qual nada seria possível. Ele que permitiu que eu sonhasse com este dia e me deu forças e coragem para buscá-lo. Por ter me guiado e amparado em cada obstáculo, pelo conforto nos momentos de provação. Infinitamente obrigada, por permitir que tornasse real este tempo de tão grande crescimento profissional e pessoal. Também agradeço Maria, que como MÃE foi intercessora e sempre passou à minha frente, abrindo os caminhos e cuidando de tudo que eu não era capaz de resolver.

Aos meus pais, que mesmo sem entender a fundo o que este estudo representava, sempre sonharam comigo. A minha mãe, qualquer agradecimento é pouco, obrigada por ser um anjo em minha vida, pelo apoio, paciência e força que sempre me transmitiu, obrigado por ser muito mais do que eu mereço, por me acalmar, encorajar, confortar e aconselhar. Ao meu pai Antônio, por ser um exemplo de trabalho e dedicação, por suas mãos calejadas que nunca deixaram faltar o sustento a nossa mesa, por sua inteligência admirável e pelo apoio incondicional aos estudos de seus filhos. O que vocês fizeram e fazem, na sua simplicidade e honestidade, é muito maior que o apoio com grandes fortunas, e sou eternamente grata a tudo!

Aos meus irmãos: Zeliane, Fábio e Marco, admiro cada um de maneira única, com suas qualidades e dons. Muito obrigada pela ajuda e por deixarem impresso em mim, tanta admiração. Meu irmão Marco, em especial, muito obrigada pela ajuda e por ser fonte de inspiração, trilhando comigo os caminhos da vida científica. Aos meus sobrinhos: Rian e Luísa, amo vocês. Aos meus cunhados, muito obrigada por toda torcida!

Ao meu namorado Filipe, sou eternamente grata por todo apoio, paciência, ajuda (que foi essencial) e compreensão por tantos momentos de ausência (incontáveis feriados e finais de semana). Te admiro e te amo muito!

Ao Professor Alexandre, por me orientar e ajudar desde os tempos do mestrado. Por possibilitar que pudesse adentrar mais a fundo nos caminhos da vida científica, permitindo assim, que minha admiração e amor por estes caminhos se tornassem ainda maiores. Agradeço por permitir que este estudo fosse realizado em uma excelente estrutura física, pela paciência, pela confiança, inteligência admirável e por todos os ensinamentos transmitidos.

A Professora Fabiana e suas alunas Liliane e Gabriela pela imprescindível ajuda neste trabalho e também por todo apoio e amizade, muito obrigada.

Agradeço as minhas primeiras filhas científicas: Elisandra e Rebeca, muito obrigada por me darem a honra de orientá-las, de poder aprender e ensinar, e sentir um imenso prazer neste ato. Muito obrigada por toda dedicação e empenho, com certeza vocês terão um futuro brilhante e eu, como sua primeira orientadora, torço muito para isso!

A todos os colegas que passaram pelo laboratório, por toda a ajuda direta ou indireta minha eterna gratidão!

Aos amigos de longa data, que de que alguma forma sempre estiveram presente. Representando estes, um nome precisa ser citado: Aline, minha amiga, realmente palavras não são capazes de expressar meu eterno agradecimento a você!

Agradeço também, aos novos amigos que a caminhada científica me proporcionou. Muito obrigada por terem me amparado quando caí, pelas ajudas nos experimentos, pelas discussões científicas e principalmente pelas discussões nada científicas, em cada momento de distração, comilanças, conselhos, puxões de orelha, carinhos, palavras de força e incentivo. Vocês são anjos que Deus colocou em meu caminho, para tornar a caminhada mais leve e engraçada, e com certeza são as maiores produções, com o mais alto fator de impacto, superando publicações em revistas como *Nature* ou *Science*, e acrescentando muito mais do que poderia esperar no meu Lattes. Não teria conseguido sem vocês! Muito obrigada por tudo sempre!

Ao professor Eduardo, por permitir que pudesse ir ao seu laboratório realizar as dosagens de etanol, e a técnica Patrícia, ambos pela prestatividade, ajuda e gentileza.

Ao professor Valdemar Paffaro, por toda ajuda e apoio desde antes de iniciar o mestrado.

Agradeço aos professores do departamento, Roseli, Giovani e Renato pela convivência harmoniosa e, em especial as professoras Jalile e Sílvia, que foram minhas supervisoras no estágio docente: muito obrigada por compartilharem seu conhecimento e me ensinarem os caminhos da vida docente.

Aos técnicos Marina Venâncio, Luiz Felipe e principalmente, José do Reis. Muito obrigada pelos momentos de descontração e ajuda.

Aos membros da banca de qualificação Professores Wagner, Andrea e Eveline, pelas considerações e contribuições.

Aos funcionários que sempre zelaram pela limpeza e organização do laboratório, sem deixar de lado o sorriso e simpatia, em especial a Marília, Martha, Helena, Giselda e Zélia.

Aos funcionários do biotério central da UNIFAL-MG.

À UNIFAL-MG, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio estrutural e financeiro.

Por fim, mas não menos importante agradeço infinitamente aos pequenos roedores, que sofrem e dão a vida para propiciar melhores condições a nós, humanos.

“Aprendi que agradecer é uma forma de assegurar que algo essencial em nossas vidas nunca falte. Sendo assim, agradeço a cada um que cruzou e marcou meu caminho, e agradeço sempre, para que nunca faltem!”

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer, 1818)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King, 1963)

RESUMO

A exposição pré-natal ao álcool é potencialmente teratogênica. Os prejuízos ocasionados pelo consumo desta droga são extensos e variados, sendo sugerido que mesmo baixos níveis de exposição intraútero podem afetar negativamente o embrião e / ou feto. Por esta razão, o propósito deste estudo foi avaliar as alterações acarretadas pela exposição pré-natal ao álcool entre o 6º e 19º dias de gestação (G). Os controles consistiam de animais *pair feeding* (dieta líquida isocalórica contendo 0% de calorias derivadas de etanol) e padrão (livre acesso a ração). Os resultados demonstram que ratas e camundongos fêmeas prenhes submetidas ao tratamento com álcool na gestação apresentaram redução do consumo de dieta quando comparados ao grupo dieta livre. Este consumo refletiu menor ganho de peso nas ratas prenhes dos grupos álcool e *pair feeding*. A dosagem de etanol no sangue permitiu a detecção de concentrações compatíveis com o baixo nível de exposição. Este padrão de consumo não provocou alterações no número de filhotes nascidos por mãe. Contudo, animais do grupo álcool apresentaram alto índice de óbito pós-natal, baixo peso ao nascer e redução do peso e da distância nasoanal que permaneceram até o início da fase adulta, além de prejuízos no desenvolvimento físico no parâmetro de abertura dos olhos das fêmeas e no desenvolvimento reflexo no parâmetro de geotaxia negativa na prole feminina e no reflexo de endireitar dos machos. A avaliação comportamental da prole masculina durante a adolescência também revelou prejuízos caracterizados pela redução do comportamento social da brincadeira em animais isolados do grupo álcool e redução da ativação neuronal em regiões do córtex pré-frontal (córtex insular agranular, pré-límbico, cíngulo e piriforme) e núcleo accumbens shell. A avaliação comportamental da vida adulta apontou que a prole masculina e feminina de ratas expostas ao álcool apresentou redução na preferência pelo incentivo sexual durante o teste de motivação sexual. Também na vida adulta, a prole masculina de camundongos fêmea apresentou respostas preditivas de depressão evidenciadas pelo teste de suspensão pela cauda, e pelo aumento da ativação neuronal em áreas centrais relacionadas ao estresse (locus coeruleus e núcleo paraventricular do hipotálamo). Não foram encontradas alterações no comportamento materno durante a lactação. Tais resultados evidenciam que o consumo de baixa concentração de álcool pode acarretar prejuízos no desenvolvimento e comportamento da prole, o que enfatiza a importância da total abstinência do consumo durante a gestação.

Palavras-chave: Etanol. Gestação. Comportamento do adolescente. Transtornos de Adaptação.

ABSTRACT

Prenatal exposure to alcohol is potentially teratogenic. There are many problems caused by consumption of this drug. Some studies suggest that even low quantities of alcohol during the intrauterine life can negatively affect the fetus and / or embryo. In this work, we aim at evaluating the prejudices caused by prenatal exposure to alcohol between 6 and 19 days of gestation, by treatment with liquid diet containing 25% ethanol-derived calories. The controls consisted of pair-fed dams (receiving an isocaloric liquid diet containing 0% ethanol-derived calories) and dams with ad libitum access to control diet. The obtained results showed that pregnant rats and female mice submitted to the treatment with alcohol during the pregnancy presented reduction of the daily diet consumption, when compared to the animals (control) with alcohol-free diet. This reflected in lower weight gain, considering pregnant rats in the alcohol diet group and pair feeding. The alcohol dosage lets the detection of low levels of ethanol in the animals' blood. Consumption of these concentrations did not cause changes in the number of pups born per mother. However, alcohol group animals presented high death level after birth, low weight after born and reduction of the weight and nasoanal length which stays until the beginning of the adulthood, failures in the physical and reflexive development considering the parameters of eyes opening and negative geotaxis in females and the parameter of righting up in males. The behavioral evaluation of the males during the adolescence has also revealed prejudices as reduction of the interactions in isolated animals of alcohol group and reduction of neuronal activation in regions of the prefrontal cortex (agranular insular, pre-limbic, cingulate and piriform) and accumbens shell in play behavior test. In addition to these changes, the behavioral evaluation during adult life indicated that the male and female offspring of rats exposed to alcohol presented a reduction in the preference for the sexual incentive during the sexual motivation test. Also the evaluation of the adulthood pointed out predictive response of depression, evidenced by the tail suspension test and increased neuronal activation in central areas related to stress (Locus coeruleus and paraventricular nucleus of the hypothalamus). It is important to note that we do not find alterations in the maternal behavior during the lactation. The results presented here in shows evidence that, low concentrations of alcohol are teratogenic for the offspring, generating physical and behavior problems and emphasizing the importance of abstinence from alcohol consumption during gestation.

Keywords: Ethanol. Pregnancy. Adolescent Behavior. Adjustment Disorders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	- Aspectos craniofaciais da SAF.....	25
Figura 02	- Avaliação das ratas prenhes durante o tratamento com dieta líquida.....	41
Figura 03	- Avaliação do desenvolvimento da prole de ratas.....	42
Figura 04	- Avaliação comportamental da prole de ratas.....	42
Figura 05	- Avaliação dos camundongos fêmeas prenhes durante o tratamento com dieta líquida.....	43
Figura 06	-Avaliação da prole no DPN 2 e do comportamento materno de camundongos fêmeas lactantes.....	43
Figura 07	-Avaliação do comportamento da prole de camundongos fêmeas lactantes na fase juvenil e vida adulta.....	43
Figura 08	- Aparato do teste placa com buracos.....	50
Figura 09	- Comportamento social da brincadeira.....	51
Figura 10	- Campo aberto.....	52
Figura 11	- Esquema aparato claro-escuro.....	53
Figura 12	- Esquema do teste de nado forçado.....	54
Figura 13	- Esquema do teste de suspensão pela cauda.....	54
Figura 14	- Teste de enterrar esferas.....	55
Figura 15	- Esquema do aparato de três câmaras.....	56
Figura 16	- Esquema do aparato do teste de motivação sexual.....	58
Figura 17	-Avaliação da ativação neuronal após exposição ao teste de comportamento social da brincadeira após exposição à condição de alojamento isolado (<i>play behavior</i>) ou suspensão pela cauda (SPC).....	60
Figura 18	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a ingestão e ganho de peso de ratas prenhes.....	63
Figura 19	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a ingestão e ganho de peso de camundongos fêmeas prenhes.....	64
Figura 20	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a viabilidade da prole de camundongos no DPN 2.....	66
Figura 21	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o peso corporal dos filhotes machos e fêmeas de ratas	67

Figura 22	- Efeitos da exposição pré- natal ao álcool sobre o peso ao nascer (DPN2) da prole de ratas	68
Figura 23	- Efeitos da exposição pré- natal ao álcool sobre a distância nasoanal da prole de ratas	69
Figura 24	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o índice anogenital no DPN 21 da prole de ratas	69
Figura 25	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento físico da prole de ratas	71
Figura 26	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento reflexo da prole de ratas	72
Figura 27	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento não materno dos camundongos fêmeas lactantes.....	73
Figura 28	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento materno dos camundongos fêmeas lactantes.....	74
Figura 29	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento da prole masculina de camundongos durante a adolescência no teste de placa com buracos.....	75
Figura 30	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento social da brincadeira durante a adolescência da prole masculina de camundongos	78
Figura 31	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no AI.....	79
Figura 32	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no Pir.....	80
Figura 33	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no Cg.....	81
Figura 34	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no AcbSh...	82
Figura 35	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no PrL.....	83
Figura 36	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de campo aberto.....	84
Figura 37	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de claro-escuro.....	85

Figura 38	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de nado forçado.....	86
Figura 39	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de suspensão pela cauda.....	87
Figura 40	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do teste de SPC na expressão de células positivas para c-fos no PVN.....	88
Figura 41	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do testes de SPC na expressão de células positivas para c-fos no LC.....	89
Figura 42	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de enterrar esferas.....	90
Figura 43	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole de camundongos durante a vida adulta no Aparato de três câmaras.....	91
Figura 44	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de ratas no Teste de motivação sexual durante a vida adulta.....	92
Figura 45	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole feminina de ratas no Teste de motivação sexual durante a vida adulta.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	- Composição nutricional dieta líquida.....	41
Tabela 02	-Análises de variância de duas vias do consumo de dieta líquida por ratas ou camundongos fêmeas prenhes.....	63
Tabela 03	-Análise de variância de duas vias do peso de ratas ou camundongos fêmeas prenhes.....	64
Tabela 04	- Análise de variância de duas vias do peso corporal da prole de ratas.....	67
Tabela 05	- Análise de variância duas vias da distância nasoanal da prole de ratas...	68
Tabela 06	- Análise variância de duas vias do comportamento social da brincadeira durante a adolescência da prole masculina de camundongos.....	77
Tabela 07	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a viabilidade da prole de camundongos fêmeas no DPN 2, dados referentes à figura 20.....	128
Tabela 08	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o peso corporal em gramas da prole de ratas, dados referentes às figuras 21 e 22.....	128
Tabela 09	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a distância nasoanal em milímetros da prole de ratas, dados referentes à figura 23.....	129
Tabela 10	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o índice anogenital [DAG (mm) / peso (g)] da prole de ratas, dados referentes à figura 24...	129
Tabela 11	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento físico da prole de ratas (resultados em dias), dados referentes à figura 25.....	130
Tabela 12	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento reflexo da prole (resultados em dias), dados referentes à figura 25.....	130
Tabela 13	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento não materno dos camundongos fêmeas lactantes (porcentagem de observações em 120 minutos), dados referentes à figura 27.....	131
Tabela 14	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento materno dos camundongos fêmeas lactantes (porcentagem de observações em 120 minutos), dados referentes à figura 28.....	132
Tabela 15	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento da prole masculina de camundongos durante a adolescência no teste de placa com buracos, dados referentes a figura 29.....	133

Tabela 16	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento social da brincadeira durante a adolescência da prole masculina de camundongos, dados referentes á figura 30.....	133
Tabela 17	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de camundongos (resultados apresentados como número de células positivas para c-fos), dados referentes às figuras 31,32,33,34, e 35.....	134
Tabela 18	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de campo aberto, dados referentes à figura 36.....	134
Tabela 19	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de claro-escuro, dados referentes à figura 37.....	135
Tabela 20	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de nado forçado, dados referentes à figura 38.....	135
Tabela 21	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de suspensão pela cauda, dados referentes à figura 39...	135
Tabela 22	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do teste de SPC na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de camundongos (resultados apresentados como número de células positivas para c-fos), dados referentes às figuras 40 e 41.....	136
Tabela 23	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de enterrar esferas, dados referentes à figura 42.....	136
Tabela 24	-Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole de camundongos durante a vida adulta no Aparato de três câmaras, dados referentes à figura 43.....	137
Tabela 25	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de ratas no Teste de motivação sexual durante a vida adulta, dados referentes à figura 44.....	137
Tabela 26	- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole feminina de ratas no Teste de motivação sexual durante a vida adulta, dados referentes à figura 45.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AI	- Córtex insular agranular (<i>agranular insular córtex</i>)
ARBD	- Alcohol-related birth defects
ARND	- Alcohol-related neurodevelopmental disorders
BNST	- Núcleo intersticial da estria terminal (<i>bed nucleus of the stria terminalis</i>)
CeC	Amígdala central (central amygdaloid nucleus)
Cal	- Caloria
Cm	- Centímetro
Cg	- Córtex cingulado (<i>cingulate cortex</i>)
DEAF	- Desordens do Espectro Alcoólico Fetal
DI	- Decilitros
DPN	- Dia pós-natal
G	- Dia gestacional
g	- grama
H	- Hora
HHA	- Hipotálamo Hipófise Adrenal
Kcal	- quilocaloria
La / BLA	- Amígdala lateral e basolateral (lateral and basolateral amygdaloid nucleus)
LC	- Locus coeruleus (<i>Locus coeruleus</i>)
LS	- Núcleo septal lateral (<i>lateral septal nucleus</i>)
mg	- Miligrama
Min	- Minutos
n =	- Número de animais por grupo experimental
AcbSh	- Núcleo accumbens Shell (<i>accumbens nucleus, shell</i>)
OMS -	- Organização Mundial da Saúde

Pir	- Córtex piriforme (<i>piriform cortex</i>)
PrL	- Córtex pré-límbico (<i>prelimbic cortex</i>)
PVN	- Núcleo paraventricular do hipotálamo (<i>paraventricular nucleus</i>)
QI	- Quociente de inteligência
SAF-	- Síndrome Alcoólica fetal
s.c	- Via subcutânea
SNC	- Sistema nervoso central
TBE	- Tribromoetanol
II LENAD	- II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas
°C	- Graus célsius
±	- Mais ou menos
<	- Menor que
>	- Maior que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	Álcool e Gestação.....	24
2.2	Prejuízos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento da prole.....	26
2.3	Influência do padrão de consumo e do período gestacional de exposição ao álcool sobre a prole.....	28
2.4	Comportamento materno.....	30
2.5	Modelo de exposição ao álcool através de dieta líquida.....	31
3	JUSTIFICATIVA.....	34
4	OBJETIVOS.....	35
4.1	Objetivo Geral.....	35
4.2	Objetivos Específicos.....	35
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1	Animais.....	37
5.2	Protocolos para o acasalamento.....	37
5.2.1	RATOS <i>WISTAR</i>.....	37
5.2.2	CAMUNDONGOS <i>SWISS</i>.....	38
5.3	Grupos experimentais.....	38
5.3.1	DIETA LÍQUIDA ACRESCIDA DE ÁLCOOL.....	39
5.3.2	DIETA LÍQUIDA ISOCALÓRICA.....	39
5.3.3	DIETA LÍQUIDA LIVRE.....	39
5.3.4	DIETA PADRÃO.....	39
5.4	Dieta líquida.....	40
5.5	Delineamento experimental.....	41

5.6	Protocolos/procedimentos experimentais.....	44
5.6.1	PERÍODO PRÉ-NATAL.....	44
5.6.1.1	<i>Avaliação do ganho de peso e da ingestão dos animais prenhes.....</i>	44
5.6.1.2	<i>Dosagem dos níveis sanguíneos de etanol em ratas e camundongo fêmeas prenhes.....</i>	44
5.6.2	PERÍODO PÓS-NATAL.....	45
5.6.2.1	<i>Avaliação da viabilidade da prole pós-nascimento.....</i>	45
5.6.2.2	<i>Avaliação do desenvolvimento da prole de ratas.....</i>	45
5.6.2.3	<i>Avaliação do comportamento materno em camundongos fêmeas.....</i>	47
5.6.2.4	<i>Performance comportamental da prole</i>	48
5.6.2.4.1	<i>Avaliação da performance comportamental durante a adolescência.....</i>	49
5.6.2.4.2	<i>Avaliação da performance comportamental durante a vida adulta.....</i>	51
5.6.2.5	<i>Avaliação da ativação neuronal através da marcação da proteína c-fos por imunohistoquímica.....</i>	58
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
7	RESULTADOS.....	62
7.1	Período pré-natal.....	62
7.1.1	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL SOBRE O GANHO DE PESO E A INGESTÃO DE RATAS E CAMUNDONGOS FÊMEAS PRENHES.....	62
7.1.2	CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO SANGUE DE RATAS E CAMUNDONGOS FÊMEAS PRENHES.....	65
7.2	Período pós-natal.....	65
7.2.1	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE A VIABILIDADE DA PROLE DE CAMUNDONGOS NO DPN 2.....	65
7.2.2	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O PESO CORPORAL, DISTÂNCIA NASOANAL E ÍNDICE ANOGENITAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DE RATAS.....	66
7.2.3	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REFLEXO DA PROLE.....	70

7.2.4	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO DOS CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	72
7.2.5	PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DA PROLE	75
7.2.5.1	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no teste de placa com buracos durante a adolescência....</i>	75
7.2.5.2	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no comportamento social da brincadeira durante a adolescência.....</i>	75
7.2.5.3	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo.....</i>	79
7.2.5.4	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no campo aberto durante a vida adulta.....</i>	83
7.2.5.5	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no claro-escuro durante a vida adulta.....</i>	84
7.2.5.6	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no nado forçado durante a vida adulta.....</i>	85
7.2.5.7	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos na suspensão pela cauda durante a vida adulta.....</i>	86
7.2.5.8	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do teste de suspensão pela cauda na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo.....</i>	87
7.2.5.9	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no Teste de enterrar esferas durante a vida adulta.....</i>	89
7.2.5.10	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no Aparato de três câmaras durante a vida adulta.....</i>	90
7.2.5.11	<i>Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina e feminina de ratas no Teste de motivação sexual durante a vida adulta....</i>	92
8	DISCUSSÃO.....	94
9	CONCLUSÃO.....	108
	REFERÊNCIAS	109

APÊNDICE	128
ANEXO A	139
ANEXO B	140
ANEXO C	141
ANEXO D	142

1 INTRODUÇÃO

O álcool ou etanol na forma de bebida é uma droga lícita para consumo popularmente conhecida e encontrada em todo o planeta. Sua ingestão na maioria dos países ocidentais é amplamente adotada e a grande difusão do consumo vem da percepção de que a droga-álcool é socialmente diferenciada, sendo aceita e consumida abertamente. Embora seja extensamente difundido, é importante salientar que o álcool é uma droga que possui propriedades psicotrópicas, capaz de atuar no sistema nervoso central (SNC) acarretando mudanças comportamentais além de, potencialmente, estimular o desenvolvimento de dependência química (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Por mais que sejam conhecidos os riscos da ingestão alcoólica, o aumento da frequência do uso (sete ou mais drinques por semana ou cinco ou mais drinques por ocasião) ganha maiores proporções nos últimos anos (LARANJEIRA, 2014; ROOM; BABOR; REHM, 2005). Esse consumo é realizado tanto por homens como por mulheres, sendo o sexo feminino mais vulnerável aos seus efeitos, devido a características fisiológicas específicas da mulher (MANCINELLI; BINETTI; CECCANTI, 2006). Unindo-se a maior vulnerabilidade, embora a prevalência do alcoolismo entre mulheres seja significativamente menor que a encontrada entre os homens, estima-se que aproximadamente 20% das mulheres grávidas consomem bebidas alcoólicas, dentre as quais, 6% são classificadas como alcoolistas (PASSINI JUNIOR, 2005), o que torna o período gestacional um agravante, diante das conhecidas propriedades teratogênicas desta droga.

Nesta conjuntura, a exposição de mulheres grávidas ao álcool representa um trágico problema dessa dependência química, sendo uma das maiores consequências, a síndrome alcoólica fetal (SAF), que é caracterizada por alterações faciais, restrição de crescimento pré e/ou pós-natal, danos estruturais do SNC, entre outros prejuízos (CHUDLEY et al., 2005; MUKHERJEE; HOLLINS; TURK, 2006).

Além destas alterações, indivíduos expostos durante a vida intrauterina ao álcool podem desenvolver prejuízos cognitivos e / ou comportamentais (MARQUARDT; BRIGMAN, 2016; SOOD et al., 2001). Estes prejuízos são caracterizados por deficiências na memória de trabalho, capacidade de planejamento, flexibilidade cognitiva, formação de conceito, raciocínio e comportamento (GREEN et al., 2009; KELLY; DAY; STREISSGUTH, 2000; MATTSON et al., 1999). O que torna o consumo gestacional de álcool um dos principais responsáveis pelos quadros de comprometimento neuropsiquiátrico da atualidade (BERTRAND; FLOYD; WEBER, 2005; FLOYD et al., 2005).

Diante de suas amplas consequências, determinar uma dose “segura” para o consumo de etanol na gestação é difícil, pois além da exposição de gestantes a diferentes doses de álcool ser totalmente antiético, estudos admitem que mesmo menores níveis de exposição pré-natal a esta droga podem ser capazes de afetar negativamente o desenvolvimento embrionário e fetal (CHARNESS; SAFRAN; IKONOMIDOU et al., 2000; PERIDES, 1994). Deste modo, perante o crescimento do uso de bebidas alcoólicas por mulheres, unida a incapacidade de afirmar um nível de consumo que não acarrete prejuízos sobre a gestante e o desenvolvimento embrionário / fetal, faz-se necessária a realização de estudos que venham acrescentar conhecimento acerca dos prejuízos acarretados pelo consumo desta droga durante a gestação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil a média da exposição *per capita* ao álcool puro entre os anos de 2008-2010 foi de 8,7 litros por pessoa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Embora os homens bebam maiores quantidades e mais intensamente que as mulheres (LARANJEIRA, 2014), a mulher é mais vulnerável aos efeitos do álcool, o que torna o aumento do consumo um fator preocupante.

Tal vulnerabilidade feminina ocorre em decorrência da maior absorção, elevada proporção de gordura corpórea e reduzida quantidade de água total no organismo, que juntamente com fatores relacionados ao metabolismo da droga, fazem com que a mulher apresente maior biodisponibilidade do álcool e deste modo, mesmo que ocorra um consumo idêntico, as concentrações séricas de etanol se apresentarão maiores na mulher do que no homem (MANCINELLI; BINETTI; CECCANTI, 2006).

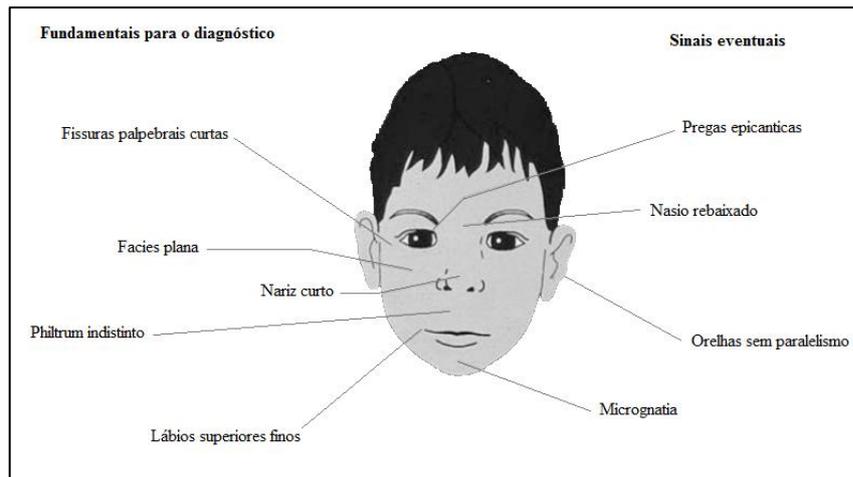
Unindo-se à maior vulnerabilidade, informações do II Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD), apontam o crescimento do consumo frequente entre mulheres (passando de 27 % em 2006 para 38 % em 2012) (LARANJEIRA, 2014). Tal informação torna-se ainda mais preocupante quando considerado que a elevação do consumo encontra-se entre mulheres com idade reprodutiva (LARANJEIRA, 2014), propiciando o risco da ingestão durante a gestação, fase em que a exposição ao álcool adquire um agravante adicional.

2.1 Álcool e Gestação

O agravante do consumo de bebidas alcoólicas na gestação é associado a uma ampla gama de consequências para o concepto, que incluem deste o aborto até prejuízos como deficiência mental, distúrbios comportamentais, restrição de crescimento e características faciais dismórficas (HOYME et al., 2005; LEMOINE et al., 2003; MESQUITA, 2010). Essas alterações geralmente são definidas globalmente como desordens do espectro alcoólico fetal “DEAF” (*FASD – fetal alcohol spectrum disorders*) (BARR; STREISSGUTH, 2001; ROOZEN et al., 2016). DEAF é um termo genérico utilizado para categorizar alterações decorrentes da exposição pré-natal ao álcool. O termo SAF é utilizado quando o diagnóstico é baseado em diferentes alterações, caracterizadas por um conjunto de anomalias faciais (Figura 01), retardo no crescimento e alterações no SNC, que podem resultar em problemas de aprendizagem e/ou comportamento, entre outros (CARTER et al., 2016; GUPTA; GUPTA;

SHIRASAK, 2016; STREISSGUTH et al., 1991; WALKER; EDWARDS; HERRINGTON, 2016). A SAF, os defeitos congênitos relacionados ao álcool (ARBD - alcohol-related birth defects) e as desordens de neurodesenvolvimento relacionadas ao álcool (ARND - alcohol-related neurodevelopmental disorders) são abrangidos pelas DEAF, sendo o mais grave destes distúrbios representado pela SAF (HOYME et al., 2005).

Figura 01- Aspectos craniofaciais da SAF.



Fonte: Adaptado de Clarke e Gibbard, 2013.

Os danos acarretados pela exposição ao álcool durante a gestação ocorrem inicialmente em decorrência da permeabilidade da placenta ao etanol. Deste modo, após ser consumido, o álcool entra na circulação materna e atravessa rapidamente a placenta se difundindo para corrente sanguínea do feto e líquido amniótico. Como a difusão passiva do álcool ocorre por gradiente de concentração, em cerca de uma hora, os níveis de etanol no sangue fetal e no líquido amniótico são quase equivalentes aos do sangue da gestante (BURD et al., 2007). Embora a gestante e o feto adquiram concentrações de álcool semelhantes, a exposição fetal é muito maior, pois seu metabolismo e eliminação são processos mais lentos, em decorrência da placenta humana apresentar apenas mínima capacidade metabólica para o álcool e do fígado fetal ser imaturo e não possuir um efetivo sistema para remoção desta droga (BURD et al., 2007). Como consequência, a redução dos níveis de álcool ocorre primordialmente pela sua reentrada na circulação materna fazendo com que os tecidos fetais e líquido amniótico permaneçam impregnados de álcool não modificado (etanol) e acetaldeído (metabólito do etanol) até a total metabolização materna (BURD et al., 2007).

Após sua metabolização, o álcool é transformado em acetaldeído, que se torna o primeiro metabólito na circulação materna e fetal. Pesquisas demonstram que em culturas de células astrogliais do sistema nervoso, o acetaldeído impossibilita o crescimento e a migração

neuronal propiciando a ocorrência de microcefalia, além de causar morte celular por necrose ou apoptose em decorrência do estresse oxidativo (GOODLETT; HORN, 2001). Também, como consequência da exposição prolongada ao etanol, pode ocorrer indução da formação de radicais livres de oxigênio, que são capazes de danificar proteínas e lipídeos celulares, aumentando a apoptose e prejudicando a organogênese (BOSCO; DIAZ, 2012). Unindo-se a estes efeitos, o álcool ainda pode acarretar vasoconstrição no cordão umbilical e na placenta, ocasionando o aumento da duração da exposição fetal como consequência do fluxo sanguíneo reduzido (BOSCO; DIAZ, 2012).

Em decorrência dessas ações no ambiente intrauterino, o álcool age sobre o embrião ou feto em desenvolvimento podendo acarretar alterações estruturais e/ou funcionais, o que permite sua classificação como agente teratogênico.

2.2 Prejuízos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento da prole

O álcool é o agente teratogênico mais utilizado no mundo e suas consequências apresentadas em inúmeras pesquisas clínicas e experimentais. O consumo durante a gestação se mostra claramente nocivo para o descendente, podendo afetar o desenvolvimento embrionário / fetal e até aumentar os riscos de aborto (ABEL, 1982; ORNOY; ERGAZ, 2010).

Tais consequências podem ser evidenciadas pelo retardo de crescimento, distorções faciais características como lábio superior fino, ausência de sulco nasolabial, fissuras palpebrais pequenas e alterações no SNC, sendo ainda descrito como uma das maiores causas de retardo mental (JONES, et al., 1973).

Neste contexto, os prejuízos cognitivos e o comprometimento das habilidades neurocomportamentais são um dos seus mais devastadores danos (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996), com estudos que apontam que descendentes de mães que mantiveram o consumo de álcool durante a gestação podem desenvolver déficits no processamento da memória e respostas preditivas de hiperatividade (BOND; DI GIUSTO, 1976; RASMUSSEN, 2005). Unindo-se a estes relatos, trabalhos demonstram que o consumo de álcool durante a gestação afeta de forma variável respostas comportamentais críticas para a sobrevivência, como déficit de aprendizagem (LEE; RABE, 1999), comportamentos preditivos de depressão e ansiedade (CALDWELL et al., 2008; HELLEMANS et al., 2008),

além de prejuízos no desempenho em situações de condicionamento operante, como inibição da resposta ao estresse (CHOTRO; ARIAS; LAVIOLA, 2007).

Embora esses danos sejam comumente evidenciados pela redução da função intelectual, é importante salientar que indivíduos com alterações acarretadas pelo álcool se diferenciam da população com retardo mental por causa de adicionais problemas no domínio social, sendo esta hipótese confirmada por estudos que demonstram que déficits do comportamento social de crianças com SAF são mais evidentes do que em crianças com similar QI, mas que não foram expostas ao álcool (THOMAS et al., 1998). E deste modo, diante da variabilidade das DEAF, e por apresentarem perfis comportamentais semelhantes, esta pode ser comumente confundida com condições como o Transtorno do Espectro Autista (BISHOP; GAHAGAN; LORD, 2007).

Estudos apontam que tais prejuízos neurocomportamentais são decorrentes de danos no SNC, manifestados fisicamente por mudanças na morfologia do cérebro, como microcefalia, redução do volume neuronal, entre outras alterações e funcionalmente por redução do QI (quociente de inteligência) (ABBOTT et al., 2016; ARCHIBALD et al., 2001; FISH et al., 2016; ROEBUCK; MATTSON; RILEY, 1998; STREISSGUTH; BARR; SAMPSON, 1990; TREIT et al., 2016). Casos clínicos humanos evidenciam que o abuso do consumo alcoólico durante o período gestacional pode influenciar a ocorrência de anomalias neuroanatômicas, tais como, a redução do tamanho cerebral, favorecendo assim, alterações nas funções cognitivas e comportamentais (CHEN et al., 2003).

Unindo-se a estes trabalhos, achados de estudos *in vivo* demonstram alterações associadas ao etanol na migração de neurônios na glia radial e na astrogliogênese (ARONNE et al., 2011; FAKOYA, 2005). Resultados que apontam as células gliais como alvo da toxicidade do etanol durante o desenvolvimento cerebral, sugerindo esta, como uma das justificativas para as alterações do desenvolvimento neurológico observadas na exposição intrauterina ao álcool (GUERRI; PASCUAL; RENU-PIQUERAS, 2001).

É importante destacar que os prejuízos neurocomportamentais acarretados pela exposição pré-natal ao álcool se manifestam de forma muito variada, sendo tal variabilidade resultado de condições como o padrão de consumo materno, o período gestacional de exposição e fatores de risco, que unidos irão delimitar o perfil das consequências sobre os descendentes.

2.3 Influência do padrão de consumo e do período gestacional de exposição ao álcool sobre a prole

O grau dos prejuízos acarretados pela exposição intrauterina ao álcool difere de pessoa para pessoa, e são decorrentes de fatores como o período de exposição durante a gravidez, padrão de consumo materno, diferenças no metabolismo materno e diferenças na susceptibilidade genética (MAIER; WEST, 2001).

Com relação ao período de exposição, após a fecundação o desenvolvimento do conceito divide-se em três fases distintas (pré-embrionário, embrionário e fetal) e cada um destes períodos apresenta susceptibilidade diferenciada aos efeitos do álcool. A primeira fase da gestação é formada pelo período de implantação ou pré-embrionário, que corresponde em humanos até o final da segunda semana e em roedores aos cinco primeiros dias (DAMASCENO et al., 2008). De acordo com a revisão realizada por Becker, Diaz-Granados e Randall (1996), os efeitos do etanol durante esta fase inicial são pouco estudados, possivelmente porque a exposição normalmente resulta em aborto espontâneo ou reabsorção do embrião. Além disso, evidências apontam que a exposição ao álcool pode produzir malformações em 80 a 100 % dos fetos viáveis (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996).

O período embrionário que em humanos corresponde da 3^a a 8^a semana pós-fecundação e em roedores do 6^o ao 15^o dia de prenhez é uma fase de pico com relação à divisão celular, diferenciação e morfogênese, o que torna este período muito sensível a mudanças e aos insultos teratogênicos, devido a rápidas transformações de migração celular e crescimento (DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996; DAMASCENO et al., 2008). Nesta fase, a maioria dos estudos evidencia que o etanol diminui o crescimento fetal e eleva a incidência de malformações do esqueleto e órgãos. É importante ressaltar que, embora a exposição ao álcool durante este período resulte em anomalias (craniofaciais, cerebral, cardíaca, urogenital e esquelética), o perfil específico destas é diretamente dependente do tempo de insulto e da dose utilizada (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996). Já a exposição durante o período fetal, fase de crescimento e maturação, que corresponde aproximadamente da 9^a semana de gravidez até o nascimento em humanos e engloba do 15^o dia de prenhez até aproximadamente aos dez primeiros dias pós-nascimento em roedores, é menos sensível a alterações morfológicas, pois o desenvolvimento da maioria dos órgãos já foi concluído, sendo uma fase citada por acarretar retardo do crescimento e anomalias estruturais no cérebro, que repercutem prejuízos comportamentais durante a infância,

adolescência e/ou vida adulta da prole (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996; DAMASCENO et al., 2008).

Assim como a fase gestacional, o padrão de exposição ao álcool também pode influenciar diretamente as consequências sobre a prole (MARQUARDT; BRIGMAN, 2016). Tanto estudos em humanos como pesquisas animais têm demonstrado que o consumo pesado ou em *binge* (altas concentrações de álcool de uma só vez) são mais associados com déficits físicos, cognitivos e comportamentais, como a SAF (CLARREN et al., 1978; MAIER et al., 1999). Estes trabalhos sugerem que a exposição pré-natal ao álcool produz efeitos dose-resposta, estando os níveis elevados associados a impactos e problemas de desenvolvimento mais graves.

Já com relação aos efeitos do baixo padrão de exposição, os resultados apresentados na literatura clínica ainda são insuficientes e controversos, com estudos que sugerem a ausência de danos como a prematuridade do parto, do baixo peso no nascimento, inexistência de malformações e a ausência de prejuízos no neurodesenvolvimento, no tempo de processamento da informação e no QI (FALGREEN ERIKSEN et al., 2012; KESMODEL et al. 2012; KILBURN et al., 2015; LUNDSBERG et al., 2015; MILLS; GRAUBARD, 1987). Contrapondo-se a estes estudos, pesquisas apontam que mesmo baixas concentrações podem ser danosas á prole, prejudicando a composição do leite e seu consumo pelos filhotes, acarretando prejuízos no desenvolvimento esquelético, repercutindo no aumento das respostas agressivas e dos comportamentos preditivos de ansiedade, além de ser capaz de acarretar danos no SNC (CHARNESS; SAFRAN; PERIDES, 1994; CULLEN et al., 2013; PROBYN et al., 2013; SOOD et al., 2001) .

Neste contexto, embora a maioria dos estudos avaliem os efeitos da exposição intrauterina a altas concentrações de álcool, estima-se que a maior parte das exposições neste período seja relacionada ao baixo padrão de consumo. Isto porque, embora antes da gravidez 48,5% das mulheres relatam a ingestão moderada / pesada de álcool (SOOD et al., 2001), após a concepção e durante a gestação, mesmo que quase um quarto das mulheres negue qualquer exposição, grande parte das que assumem o consumo de álcool (63,8%) declara que realiza o baixo índice de exposição e apenas 13% afirmam o consumo moderado ou pesado, demonstrando que por mais que ocorra a redução do uso durante a gestação, esse ainda pode persistir, mesmo que em menores concentrações (SOOD et al., 2001). Deste modo, pesquisas que avaliem os danos acarretados pelo baixo padrão de exposição ao álcool, são necessárias, pois possibilitam a melhor compreensão das consequências negativas e permitem a conscientização dos perigos de beber durante a gravidez.

Além do padrão de consumo e do período gestacional de exposição, o cuidado ofertado pela mãe durante o período de lactação, também pode acarretar influências sobre o grau de prejuízos manifestados pela prole, sendo capaz de ocasionar ou potencializar danos.

2.4 Comportamento materno

Isto ocorre porque após o nascimento, os filhotes apresentam capacidade sensorial limitada, são desprovidos de pelos, incapazes de ver, ouvir, locomover, regular a temperatura corporal e alimentar sozinhos, o que os torna totalmente dependentes da genitora. Neste contexto, com o intuito de prover a sobrevivência da prole, a mãe desenvolve o comportamento materno, caracterizado por respostas ou ações que, especificamente, apoiam o desenvolvimento de seus descendentes (BRIDGES, 2015). Tal comportamento representa uma importante forma de interação entre mães e filhos e têm a capacidade de influenciar o crescimento, fisiologia e comportamento dos descendentes (CURLEY; CHAMPAGNE, 2015).

Diante da conhecida importância do cuidado materno para a sobrevivência e desenvolvimento da prole, estudos apontam a dependência da estabilidade entre a relação mãe-infante. Dentre os fatores que o cuidado materno pode exercer influência, pesquisadores sugerem alterações no comportamento adulto dos filhotes, tornando-os hiper-responsivos ao estresse e, conseqüentemente, mais suscetíveis a doenças (NEWPORT; STOWE; NEMEROFF, 2002; SEIPP; JOHNSTON, 2005). Um exemplo destes efeitos é observado em mães que apresentam alto índice de cuidado materno, e como consequência, na vida adulta sua prole manifesta menores respostas de temor frente a novos acontecimentos e baixa ativação do eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) frente a situações estressoras, o oposto do que ocorre em filhotes de mães com baixo índice de cuidado materno (FRANCIS et al., 1999).

Corroborando informações da influência do ambiente de cuidado sobre alterações das respostas, estudo de Lieberman (2000), aponta que crianças filhas de pais alcoolistas apresentam alto risco de dependência alcoólica, não somente devido às características genéticas, mas também por fatores do convívio familiar.

A literatura clínica e experimental é muito diversa com relação aos efeitos do consumo gestacional de álcool sobre o comportamento materno. Embora existam pesquisas que não demonstram alterações no comportamento materno de mães expostas ao álcool

durante a gestação (MARINO et al., 2002; POPOOLA et al., 2015), outros trabalhos sugerem prejuízos no cuidado ofertado pelas genitoras.

Com relação a humanos, estima-se que mães dependentes de substâncias químicas (principalmente o álcool) durante o período pós-natal apresentam maiores dificuldades em cuidar de suas crianças quando comparadas às mães não dependentes (SAVONLAHTI et al., 2004). Estudos animais também evidenciam alterações no comportamento materno diante do consumo no período pré-natal, demonstrando prejuízos no cuidado total com a prole, aumento dos comportamentos “negativos” dirigidos aos filhotes (como pisar e arrastar) e elevado índice de ações dirigidas ao autocuidado da mãe (autolimpeza e alimentação) (WORKMAN et al., 2015). Corroborando estes achados, Ness e Franchina (1990) demonstraram que a exposição ao álcool durante a gestação foi capaz de reduzir o número de filhotes recuperados pelas ratas lactantes, apontando prejuízos comportamentais na busca e cuidado com a prole.

Unindo-se a estes estudos, pesquisas clínicas em mães que consumiram grandes quantidades de álcool durante a gestação demonstram que estas apresentaram comportamentos maternos desfavoráveis, e que como consequência seus filhos desenvolveram redução das respostas de apego e menor segurança (O’CONNOR; KOGAN; FINDLAY, 2002). Interpretar a causa destas alterações gera confusão diante da incapacidade de separar os efeitos da díade mãe-filho, pois não está claro se as mudanças no comportamento tanto da mãe como da criança são devido inicialmente a efeitos induzidos pelo álcool sobre as crianças ou a algumas diferenças comportamentais inerentes a mães que ingerem bebidas alcoólicas durante a gravidez, ou ainda pela ação dos dois fatores (KELLY; DAY; STREISSGUTH, 2000).

Deste modo, diante de estudos que demonstram que mesmo pequenas variações no cuidado materno podem influenciar o desenvolvimento e comportamento da descendência, a avaliação deste comportamento torna-se importante e deve ser considerada em trabalhos que investigam manipulações perinatais, permitindo delimitar se as alterações em descendentes de mães que consumiram álcool são decorrentes de efeitos do tratamento alcoólico, ou mediados por alterações secundárias relacionadas a mudanças do comportamento materno ou ainda resultado sinérgico entre estes dois fatores.

2.5 Modelo de exposição ao álcool através de dieta líquida

Diante dos inúmeros fatores que podem influenciar o padrão de consequências do álcool sobre a descendência, a realização de estudos animais é importante, pois estes permitem o controle de variáveis experimentais.

Pesquisas que detém o intuito de investigar os efeitos da exposição ao álcool durante a gestação apontam o roedor como um modelo experimental plenamente apto para representar o metabolismo humano, inclusive em eventos da fase gestacional (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996). Tais estudos demonstram-se capazes de simular os efeitos da ingestão pré-natal ao álcool, reproduzindo prejuízos característicos em humanos (HANNIGAN, 1996; BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996; PROBYN et al., 2012). Além de apresentar vantagens como o controle de variáveis experimentais, o que aumenta a confiabilidade dos dados obtidos (HANNIGAN, 1996; KELLY; GOODLETT; HANNIGAN, 2009; MARQUARDT; BRIGMAN, 2016).

Dentre as várias metodologias empregadas para a exposição animal ao álcool, podem ser citados os tratamentos através de métodos invasivos (gavagem, administração intraperitoneal, sondas intragástricas e canulações) ou não invasivos (diluição do álcool diretamente na água dos animais ou em dietas líquidas). Destes, a metodologia de dieta líquida é adotada em muitos estudos, por apresentar vantagens como menor índice de estresse, manipulação e dor no animal (LIEBER; DECARLI, 1989).

Além disso, a oferta de álcool, água e nutrientes em uma única solução, torna o consumo alcoólico mais palatável para os animais, apresentando também vantagens sobre a diluição do álcool diretamente na água, pois este método pode tornar o sabor da água aversivo, fazendo com que os animais consumam o mínimo de solução possível, o que diminui também a ingestão de ração, que como consequência pode acarretar um quadro de desnutrição e desidratação.

Embora possua vantagens e seja amplamente adotada, em 1985, Rao e Larkin, demonstraram que ratas tratadas exclusivamente com dieta líquida poderiam desenvolver uma série de deficiências nutricionais, por consumirem menos calorias, minerais, vitaminas e nutrientes do que o recomendado para um desenvolvimento saudável (RAO; LARKIN, 1985). Diante deste relato iniciaram-se estudos para formulação de dietas capazes de suprir a demanda nutricional exigida pelos animais.

Atualmente existem diversas formulações de dieta líquida para o tratamento com álcool durante o período da gestação e dentre estas, inúmeros estudos propõem a exposição ao álcool através da administração de compostos nutricionais como o *Sustacal*[®] ou *Sustagem*[®] juntamente com vitaminas e água. Este é um modelo empregado com sucesso em

várias pesquisas, sendo sua adaptação definida como a metodologia para realização do presente trabalho (BLANCHARD; HANNIGAN; RILEY, 1987; CULLEN et al., 2014; HANNIGAN et al., 1988; SARI et al., 2011).

Também é importante destacar que embora o álcool possua 7,2 kcal/g e seu consumo favoreça a redução da quantidade de alimento consumido pelos animais, ele não pode ser considerado uma substância alimentícia, pois não é nutricionalmente apto para manter o organismo (DREOSTI, 1993; NESS; FRANCHINA, 1990). Assim, diante do conhecimento, de que a mãe é a principal fonte de nutrição do concepto, estando seu consumo nutricional diretamente ligado ao consumo e consequente desenvolvimento da prole (FERRARI; GABRIELLI; MELLO, 1992), o controle de variáveis nutricionais relacionadas ao álcool é essencial, para que os resultados obtidos no estudo possam realmente demonstrar a ação teratogênica desta droga sobre a mãe e sua prole e não efeitos relacionados à desnutrição materna.

Para tal controle, foi realizado o grupo *pair feeding* (pares emparelhados), no qual animais tratados com dieta líquida contendo álcool possuem controles que recebem a mesma quantidade de dieta ingerida pelos animais do grupo álcool, sendo a quantidade de calorias alcoólicas substituída por sacarose, de forma que, a dieta do grupo *pair feeding* possui a mesma concentração nutricional (isocalórica), mas sem o efeito do álcool (FIEBRE; FIEBRE, 2003; KELLY; DAY; STREISSGUTH, 2000; NESS; FRANCHINA, 1990).

3 JUSTIFICATIVA

A elevação do consumo de bebidas alcoólicas por mulheres em idade reprodutiva e o conseqüente aumento do risco da exposição a esta droga durante o período gestacional, representam grande preocupação, em razão dos efeitos negativos do álcool sobre o desenvolvimento embrionário e fetal. Neste contexto, o consumo de álcool durante a gestação é um grave problema de saúde pública, representando a maior causa de comprometimento neuropsiquiátrico não hereditário e evitável, o que desperta a atenção de autoridades médicas e sanitárias de diversos países (BURD et al., 2007; WHO, 2015).

Diante de suas propriedades teratogênicas, a ingestão de álcool durante a gestação pode ser potencialmente danosa aos descendentes mesmo após a exposição a baixas concentrações. Contudo, embora existam estudos apontando os efeitos teratogênicos do álcool, ainda são necessários trabalhos que possibilitem o acréscimo de informações acerca da diversidade de prejuízos comportamentais acarretados aos descendentes mesmo na presença do baixo padrão de exposição.

Deste modo, visto a gravidade apresentada pelo tema, a realização deste estudo apresenta grande relevância, pois possibilita o acréscimo de informações acerca da relação entre o grau de consumo e os prejuízos acarretados pelo álcool na descendência e a maior conscientização dos usuários.

4 OBJETIVOS

Para realização do presente estudo foram traçados objetivo geral e específicos.

4.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da exposição pré-natal à baixa concentração de álcool sobre parâmetros de viabilidade, desenvolvimento físico, reflexo e respostas comportamentais da prole durante a adolescência e vida adulta.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar parâmetros nutricionais e a concentração de etanol no sangue de animais prenhes expostos ao tratamento com dieta líquida acrescida de álcool.
- b) Averiguar a influência do tratamento pré-natal com baixa concentração de álcool sobre a viabilidade e o desenvolvimento da prole após o nascimento;
- c) Avaliar a repercussão do tratamento pré-natal com baixa concentração de álcool sobre a performance comportamental da prole masculina de camundongos durante a adolescência investigando respostas relacionadas a socialização através da brincadeira e comportamentos tipo depressivos e repetitivos.
- d) Avaliar a repercussão do tratamento pré-natal com baixa concentração de álcool durante a vida adulta da prole masculina e feminina de ratas no teste motivação sexual;
- e) Investigar a repercussão do tratamento pré-natal com baixa concentração de álcool durante a vida adulta da prole masculina de camundongos investigando comportamentos relacionados a ansiedade, depressão, preferência social e compulsão durante a vida adulta.

- f) Averiguar alterações na ativação neuronal de regiões encefálicas de camundongos expostos na vida intrauterina ao álcool após exposição ao comportamento social da brincadeira ou ao teste de suspensão pela cauda.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas - MG (Protocolos: 509/2013; 565/2014; 572/2014, Anexos A, B e C).

5.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* e camundongos da linhagem *Swiss* machos (35 a 45 g camundongos ou 230 a 299 g ratos) e fêmeas (28 a 35 g camundongos fêmeas ou 170 a 200 g ratas) com sete a oito semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (12 h claro/escuro: 07h00min - 19h00min).

A utilização de duas espécies de roedores foi definida diante da melhor aplicabilidade aos diferentes protocolos experimentais realizados. Ratos *Wistar* foram selecionados para os experimentos de desenvolvimento físico, reflexo, biométrico e avaliação da performance comportamental da prole no teste de motivação sexual. Já nos protocolos para avaliação do comportamento materno e respostas comportamentais durante a adolescência e vida adulta da prole masculina, os camundongos da linhagem *Swiss* apresentaram maior viabilidade por possibilitar redução dos custos com o tratamento, facilidade para confirmação do acasalamento através da análise do *plug* (ou rolha) vaginal e por permitir que maior número de animais fosse submetido aos experimentos no mesmo período.

5.2 Protocolos para o acasalamento

Diante da diferença nos métodos utilizados para constatação da prenhez em ratas e camundongos fêmeas, os protocolos são descrito divididos por espécie.

5.2.1 RATOS WISTAR

O acasalamento foi realizado ao final do dia, sendo as ratas transferidas para caixas com rato sexualmente experiente na proporção de duas fêmeas para um macho. A detecção

da prenhez foi realizada após coleta e análise em microscópio óptico do lavado vaginal no dia seguinte pela manhã (07h00min - 08h00min). Constatada a presença de espermatozoides, este foi considerado o dia gestacional zero (G0) e os animais foram separados individualmente em caixas com livre acesso à água e ração até o dia gestacional seis (G6), quando os grupos experimentais foram definidos e os tratamentos iniciados.

5.2.2 CAMUNDONGOS SWISS

O acasalamento foi realizado ao final do dia, sendo os camundongos fêmeas transferidos para caixas com camundongo macho sexualmente experiente na proporção de duas fêmeas para um macho. A confirmação da fecundação foi realizada através da análise da formação do *plug* (ou rolha) vaginal no dia seguinte pela manhã (07h00min - 08h00min). O dia em que ocorreu a formação da rolha vaginal foi considerado dia G0 e os animais foram separados individualmente em caixas com livre acesso à água e ração até o dia G6, quando os grupos experimentais foram definidos e os tratamentos iniciados.

5.3 Grupos experimentais

No G6 os animais foram divididos em grupos experimentais e foi iniciada a submissão aos tratamentos específicos até o dia gestacional 19 (G19).

O início do tratamento no G6 foi determinado visando excluir o risco de aborto, reabsorção ou má formação grave provenientes do tratamento no período pré-embrionário (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996). A exposição ao álcool por 13 dias (G6-G19) foi estabelecida para excluir a influência da abstinência alcoólica sobre os parâmetros avaliados, sendo este período determinado com base em relatos na literatura que apontam que a abstinência alcoólica em roedores pode ser implantada após 14 dias de exposição ao álcool (DEVAUD; CHADDA, 2001).

Visando favorecer a adaptação dos animais à dieta líquida, no início do tratamento (três dias - G6 até G9), animais do grupo álcool e *pair feeding*, foram privados de água e receberam juntamente com a dieta líquida, 50 % da quantidade de ração (Nuvlab[®]) consumida por um roedor (um pelete de aproximadamente 10 g para ratas e de 3,5 g para camundongos). Após o término da adaptação inicial, os animais receberam livre acesso à água e dieta líquida, sendo privados da ração padrão.

Desta maneira, os animais foram submetidos ao tratamento com álcool por 13 dias, sendo os três dias iniciais utilizados como período de adaptação à dieta líquida. A adoção desta medida mostrou-se eficaz para reduzir a perda de peso relacionada ao início do tratamento com a dieta líquida, favorecendo a aceitabilidade e adaptação dos animais.

5.3.1 DIETA LÍQUIDA ACRESCIDA DE ÁLCOOL

Aos animais do grupo álcool foi permitido o livre acesso à dieta líquida acrescida com 25 % de calorias alcoólicas.

5.3.2 DIETA LÍQUIDA ISOCALÓRICA

Os animais do grupo *pair feeding* foram tratados com dieta líquida semelhante à dieta oferecida aos animais do grupo álcool, contudo a porcentagem de calorias alcoólicas da dieta destes animais foi substituída por sacarose, tornando a dieta líquida isocalórica a dieta com álcool.

Os animais deste grupo experimental não tiveram livre acesso a dieta líquida, recebendo apenas a mesma quantidade de dieta que os animais do grupo álcool consumiram. Desta forma, o consumo deste grupo funcionou de modo emparelhado “*pair feeding*” ao do álcool o que possibilitou o controle de variáveis experimentais relacionadas ao menor consumo de dieta pelos animais expostos ao álcool (FIEBRE; FIEBRE, 2003; KELLY; DAY; STREISSGUTH, 2000; NESS; FRANCHINA, 1990;).

5.3.3 DIETA LÍQUIDA LIVRE

Para avaliar os efeitos que a menor ingestão da dieta líquida acrescida de álcool poderia acarretar, animais deste grupo experimental receberam livre acesso a dieta líquida sem álcool (isocalórica), sendo realizada a avaliação da ingestão e a evolução do peso o que permitiu delimitar, a quantidade de dieta que animais do grupo álcool e *pair feeding* consomem a menos e o possível efeito relacionado a esta variável sobre o ganho de peso.

5.3.4 DIETA PADRÃO

Os animais prenhes do grupo padrão receberam acesso contínuo à água e ração “padrão” do Biotério (Nuvlab[®]).

5.4 Dieta líquida

Os animais do grupo dieta líquida foram tratados com dieta fortificada contendo em sua formulação 20 gramas de *Sustagem*[®] sabor chocolate, acrescido de suplemento vitamínico para roedores *Roovit*[®] (0,33 mL) diluídos em 100 ml de água. A formulação da dieta foi adaptada de trabalhos da literatura e selecionada diante de relatos experimentais que demonstraram a adesão dos animais ao consumo (CULLEN et al., 2014; SARI et al., 2011). A dieta líquida foi preparada com ou sem o acréscimo de álcool:

Dieta Líquida acrescida de álcool (grupo álcool): no grupo tratado com álcool, a dieta líquida foi acrescida de 4,47 ml (25 % de calorias derivadas do álcool) de etanol 95 % em 100 ml de dieta.

Dieta Líquida isocalórica (grupo *pair feeding* e dieta líquida livre): Os animais do grupo *pair feeding* e dieta líquida livre, também receberam dieta líquida sendo a porcentagem de calorias alcoólicas da dieta substituída por 6,415 g de sacarose, tornando esta dieta isocalórica a dieta dos animais tratados com álcool.

Tabela 01- Composição nutricional dieta líquida.

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DIETA LÍQUIDA						
100 mL de solução						
VALOR ENERGÉTICO (77 kcal)	MINERAIS			VITAMINAS		
Carboidratos	Cálcio	Magnésio	Cromo	Vitamina A	Vitamina B1	Niacina
12,5 g	157 mg	39,2 mg	6 µg	173 µg	0,58 mg	6,1 mg
Proteínas	Ferro	Zinco	Potássio	Vitamina D	Vitamina B2	Biotina
4,9 g	3,6 mg	2,4 mg	263 mg	0,43 µg	0,42 mg	12,6 µg
Gorduras totais	Fósforo	Cobre	Cloreto	Vitamina E	Vitamina B6	Ác, Pantolênico
1,1 g	144,5 mg	340 µg	136 mg	2,57 mg	0,50 mg	1,27 mg
Gorduras saturadas	Iodo	Manganês		Vitamina C	Vitamina B12	Colina
0,7 g	52 µg	0,8 mg		21,9 mg	0,74 µg	34,28 mg
Sódio				Vitamina K	Ácido Fólico	Inositol
59 mg				2,23 mg	83 µg	9 mg

Fonte: Da autora

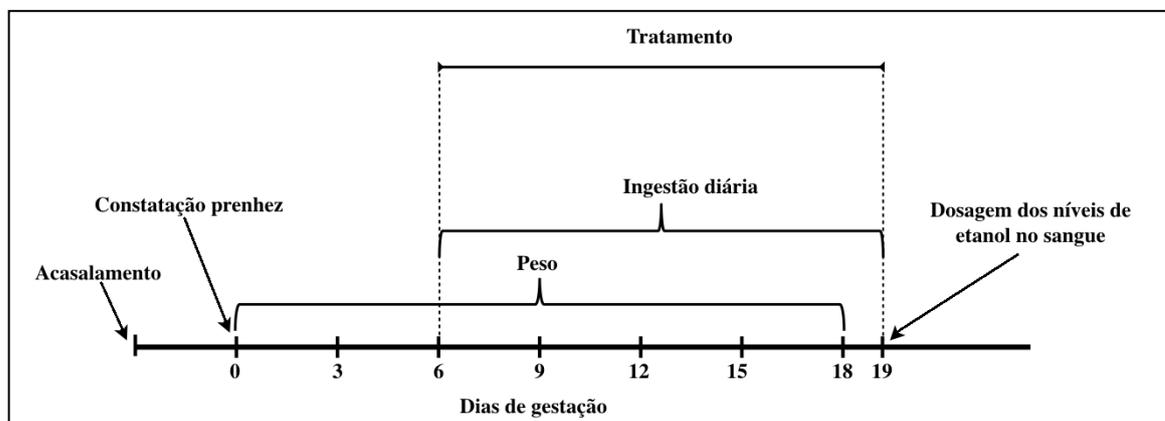
Nota: Valores apresentados conforme informações fornecidas pelos fabricantes (Sustagem[®] e Roevit[®]).

5.5 Delineamento experimental

Visando facilitar a compreensão dos experimentos realizados, a seguir é apresentado o delineamento experimental em linhas temporais.

- EXPERIMENTOS REALIZADOS EM RATOS WISTAR

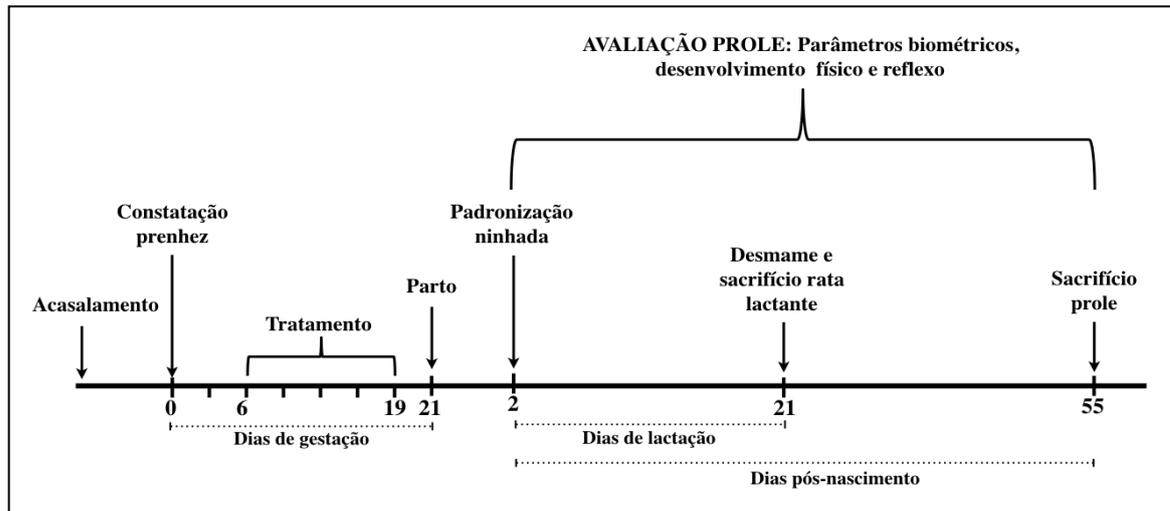
Figura 02: Avaliação das ratas prenhes durante o tratamento com dieta líquida.



Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal do tratamento com dieta líquida acrescida de álcool: avaliação do peso, da ingestão diária e dosagem dos níveis de etanol no sangue de ratas prenhes.

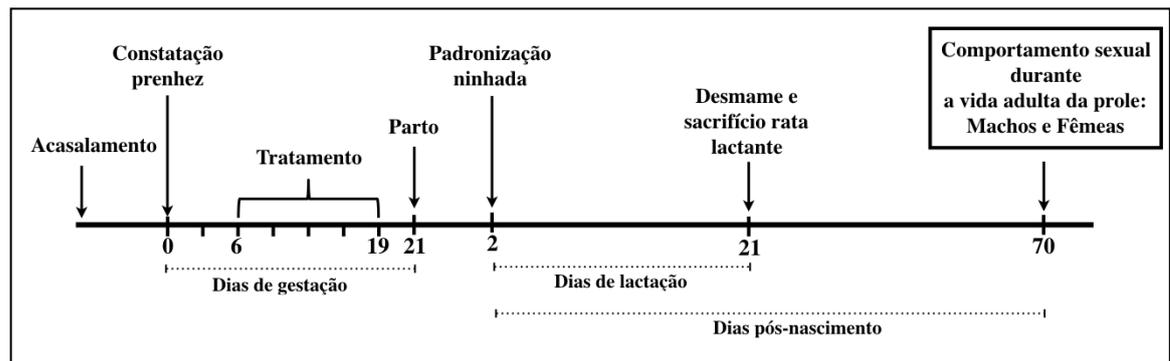
Figura 03- Avaliação do desenvolvimento da prole de ratas.



Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal da avaliação dos parâmetros biométricos e de desenvolvimento físico e reflexo da prole de ratas.

Figura 04- Avaliação comportamental da prole de ratas.

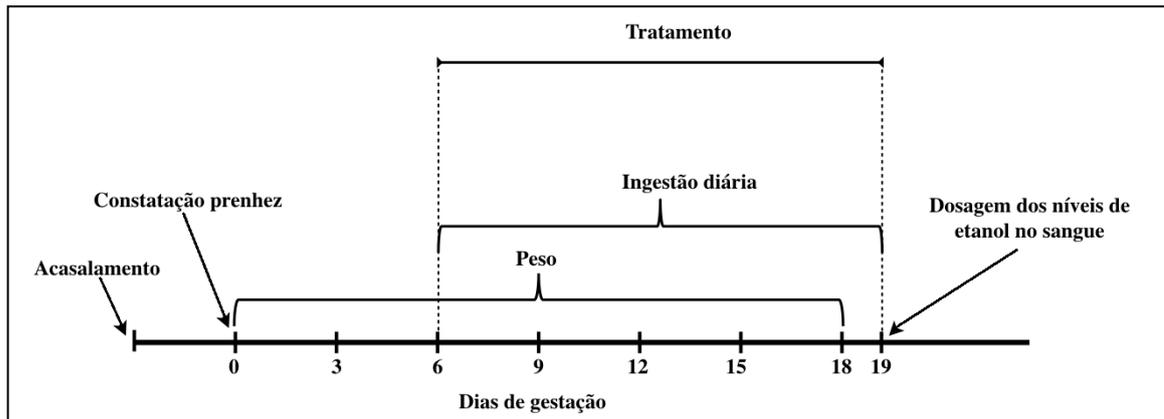


Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal da avaliação da preferência sexual durante a vida adulta da prole masculina e feminina de ratas.

- EXPERIMENTOS REALIZADOS EM CAMUNDONGOS SWISS

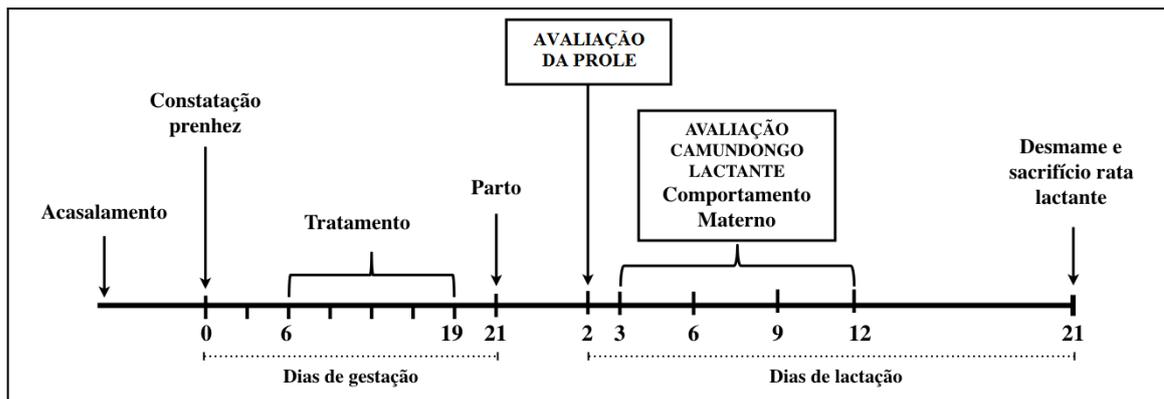
Figura 05- Avaliação dos camundongos fêmeas prenhes durante o tratamento com dieta líquida.



Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal do tratamento com dieta líquida acrescida de álcool, avaliação do peso, da ingestão diária e dosagem dos níveis de etanol no sangue dos camundongos fêmeas prenhes.

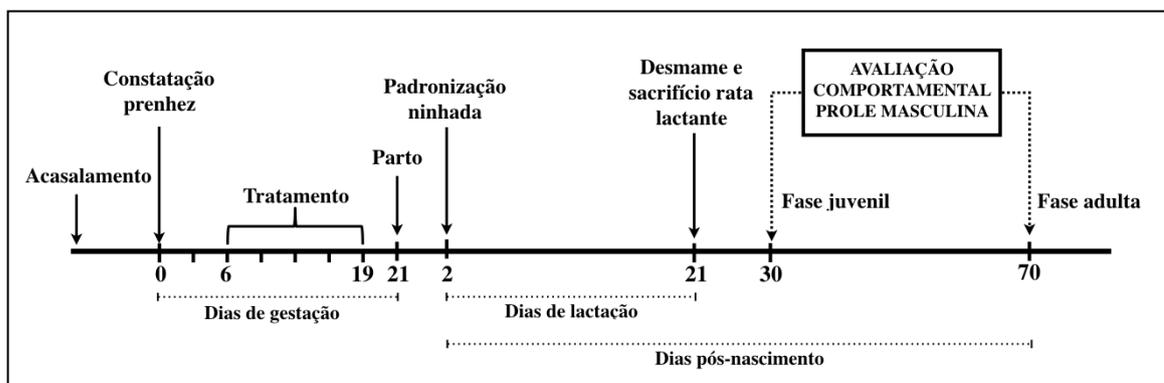
Figura 06- Avaliação da prole no DPN 2 e do comportamento materno de camundongos fêmeas lactantes.



Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal da avaliação da viabilidade prole (número de filhotes nascidos por mãe, peso ao nascer e mortalidade no DPN2) e do comportamento materno de camundongos fêmeas lactantes.

Figura 07- Avaliação do comportamento da prole de camundongos fêmeas lactantes na fase juvenil e vida adulta.



Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal da avaliação da prole comportamental da prole de camundongos fêmeas lactantes no 30º (fase juvenil / adolescência) e 70º (vida adulta) dias pós-nascimento.

5.6 Protocolos/procedimentos experimentais

Os protocolos e procedimentos realizados no estudo são apresentados de acordo com o período de avaliação: período pré-natal ou pós-natal.

5.6.1 PERÍODO PRÉ-NATAL

A seguir são descritas todas as avaliações realizadas antes do nascimento da prole. Estas análises foram determinadas com o intuito de avaliar a influência do consumo de álcool e da metodologia adotada sobre os animais prenhes.

5.6.1.1 Avaliação do ganho de peso e da ingestão dos animais prenhes

Durante a gestação ratas e camundongos fêmeas prenhes foram pesados a cada três dias e a quantidade de dieta ingerida pelos grupos dieta líquida (com álcool e sem álcool) monitorada diariamente, para realização do controle *pair feeding*.

A avaliação da ingestão diária de dieta foi realizada em animais do grupo dieta líquida acrescida de álcool e dieta líquida livre (sem o acréscimo de álcool) e a avaliação do peso realizada em animais do grupo dieta líquida acrescida de álcool, dieta líquida livre e dieta líquida *pair feeding*. O número de animais utilizados neste experimento foi: dieta líquida livre: 7 ratas prenhes, 7 camundongos fêmeas prenhes; dieta líquida *pair feeding*: 6 ratas prenhes, 12 camundongos fêmeas prenhes e dieta líquida álcool: 8 ratas prenhes, 12 camundongos fêmeas prenhes.

5.6.1.2 Dosagem dos níveis sanguíneos de etanol em ratas e camundongos fêmeas prenhes

Ao término do período de tratamento, animais do grupo álcool (ratas: n= 9; camundongos: n= 6) foram sacrificados por decapitação e as amostras de sangue coletadas em tubos heparinizados. Este procedimento foi realizado três horas após o início do ciclo escuro (22h00min), sendo este horário estabelecido com base em relatos da literatura que apontam maiores picos de concentração de álcool no sangue dos roedores (CLAUSING, et al., 1995). O método de escolha para análise das amostras sanguíneas foi o de Cromatografia gasosa (dcg/L) e o procedimento realizado no Laboratório de Toxicologia da Unifal - MG.

A Cromatografia gasosa foi realizada utilizando um modelo de cromatógrafo a gás (GC1000, Ciola & Gregori, São Paulo - SP, Brasil). A curva de calibração padrão foi construída em uma amostra de sangue branco dos animais, fortificada com etanol 0,2 - 4,0 g/L, e usando butanol, a 1,0 g/L, como padrão interno. Para análise, 0,5 ml de cada padrão analítico e 0,5 ml da solução de butanol foram adicionados a um balão de vidro de 5 ml, que foi selado e colocado em estufa previamente aquecida a 80 ° C durante 10 min. Após esse período, a camada superior foi homogeneizada por três operações de tomada e devolução do vapor e 0,1 mL do vapor obtido das amostras foi injetado no cromatógrafo para a análise.

5.6.2 PERÍODO PÓS-NATAL

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como 1º dia de lactação. No 2º dia de lactação as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes, na proporção de quatro machos e quatro fêmeas.

Para o estudo da prole, foi selecionado aleatoriamente apenas um filhote macho e uma fêmea de cada ninhada, com intuito de minimizar variáveis relacionadas ao “efeito ninhada” (LAZIC; ESSIUX, 2013).

A seguir são descritas todas as avaliações realizadas após o nascimento da prole.

5.6.2.1 Avaliação da viabilidade da prole no DPN 2

A avaliação da viabilidade da prole no pós-nascimento, foi realizada no dia pós-natal (DPN) dois, durante o período da manhã (08h00min - 11h00min). Os parâmetros avaliados foram:

- a) *Número de filhotes por mãe* (n= 45 mães do grupo álcool, 38 mães do grupo *pair feeding*, 7 mães do grupo dieta livre e 37 do grupo dieta padrão).
- b) *Número de filhotes que se encontravam mortos* (n= 28 mães do grupo álcool, 25 mães do grupo *pair feeding*, 7 mães do grupo dieta livre e 26 do grupo dieta padrão).
- c) *Peso total da prole padronizada com 8 filhotes* (n= 15 mães do grupo álcool, 15 mães do grupo *pair feeding*, 7 mães do grupo dieta livre e 12 do grupo dieta padrão).

5.6.2.2 Avaliação do desenvolvimento da prole de ratas

Do período pós-nascimento (segundo dia) até o início da vida adulta (42° dia para fêmeas e 49° dia para machos), os filhotes foram submetidos à avaliação dos parâmetros biométricos e de desenvolvimento físico e reflexo (n= 5 mães por grupo experimental).

a) Avaliação dos parâmetros biométricos

O peso da prole foi avaliado individualmente, em machos e fêmeas, no dia pós-nascimento (DPN) 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 28, 35, 42 e 49. O comprimento nasoanal (CNA) foi medido com uso de um paquímetro, no DPN 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 em machos e fêmeas. Também com o auxílio de um paquímetro foi realizada a mensuração da distância anogenital (DAG) sendo o resultado apresentado na forma de índice anogenital (IAG), no DPN 21. O IAG é a razão entre a DAG e o peso corporal [DAG/peso(g)].

b) Avaliação do desenvolvimento físico e reflexo

A análise do desenvolvimento físico e reflexo foi realizada através de observações diárias nas proximidades dos dias em que os parâmetros deveriam ocorrer (cinco dias antes e até seu aparecimento) e registrada com base no DPN em que ocorreram. Os parâmetros analisados foram baseados em estudos de Smart e Dobbing (1971).

Desenvolvimento físico:

- a) **Desdobramento da orelha:** Considerado positivo no dia em que ocorre o “desdobramento” das orelhas que estavam “aderidas” junto ao corpo;
- b) **Abertura dos olhos:** Considerado positivo no dia em que ocorre o início da abertura ou “descolamento” de ao menos um dos olhos;
- c) **Erupção dos incisivos superiores:** Considerado positivo no dia em que ocorre o aparecimento dos dentes incisivos superiores na gengiva;
- d) **Abertura vaginal (fêmeas):** Considerado positivo no dia em que é visualizada a abertura parcial ou total da vagina;
- e) **Descida do testículo (machos):** Considerado positivo quando possível apalpar os testículos na bolsa escrotal;
- f) **Separação prepucial (machos):** Considerado positivo quando após retração do prepúcio for possível observar sua completa formação e separação.

Desenvolvimento reflexo:

- a) **Reflexo de endireitamento:** Em uma superfície plana, o animal foi colocado com o dorso voltado para baixo e foi observada sua capacidade de girar e retornar o dorso para cima;
- b) **Geotaxia negativa:** O animal foi colocado em uma plataforma com 45° de inclinação com a cabeça voltada para a base. Foi avaliada sua capacidade de reorientação através da habilidade de voltar-se com a cabeça para região superior da rampa (no mínimo 135°) em tempo inferior ou igual 60 segundos;
- c) **Apreensão Palmar:** Um reflexo naturalmente impresso no animal durante os primeiros dias pós-nascimento é sua capacidade de agarrar objetos após estímulo na região da planta de suas patas, sendo natural e esperada a perda deste reflexo após alguns dias. Assim, através do estímulo das patas dianteiras dos filhotes foi avaliado o DPN em que os animais não apresentaram mais tal reflexo;
- d) **Resposta à sensibilidade das vibrissas:** O filhote foi elevado através da cauda e teve sua face voltada para a borda de um béquer, com o objetivo de estimular o contato de suas vibrissas com a superfície vertical do recipiente. Quando apresentava o reflexo, o animal levantava a cabeça e as patas anteriores, diante do contato das vibrissas com a superfície do béquer, na tentativa de agarrar a superfície do recipiente;
- e) **Susto Auditivo:** Após o emprego de um estímulo sonoro, avaliou-se a presença da resposta de “susto”, caracterizada pelo salto e extensão dos membros do filhote;
- f) **Acuidade visual:** O filhote foi elevado através da cauda e teve sua face voltada para a borda de um recipiente com cor forte. Foi mantida uma distância segura para que o animal não tocasse o recipiente, sendo avaliada a capacidade de identificação do objeto, caracterizada pela tentativa de agarrar a superfície do mesmo.

5.6.2.3 Avaliação do comportamento materno em camundongos fêmeas

A avaliação do comportamento materno foi realizada em 30 camundongos fêmeas (10 álcool, 9 *pair feeding* e 11 padrão), durante o 3°, 6°, 9° e 12° dias de lactação, sempre no período da manhã, entre as 07h15min -12h00min.

No dia anterior ao experimento, após as 17h00min, os camundongos fêmeas lactantes e seus filhotes eram transferidos para caixas de acrílico transparente com livre acesso a água e ração e as caixas transferidas para a sala de filmagem, com controle de

temperatura (22 ± 2 °C), luminosidade e ciclo claro-escuro (07h00min– 19h00min). Na manhã do dia seguinte, o sistema de câmeras era ligado e os animais eram submetidos à filmagem durante 2 horas seguidas.

A análise dos vídeos foi feita de maneira pontual, uma vez a cada minuto, ao longo das 2 horas de filmagem (modificado de VIEIRA et al., 2013). Ao final de cada minuto o animal era avaliado sobre qual atividade estava desempenhando naquele momento. Feito isso, o vídeo foi adiantado até o próximo minuto e avaliado novamente o comportamento, para receber uma nova avaliação. Ao final da análise obteve-se um total de 120 avaliações (2 horas x 60 minutos = 120 observações) para cada animal. Os resultados obtidos foram analisados como porcentagem de ações em 120 minutos.

Parâmetros analisados:

Comportamento não maternal: Ausência de cuidado da fêmea lactante para com a prole;

Comportamentos maternos: O animal realiza ações que se caracterizam como cuidado aos filhotes. Subdividi-se em:

- a) Agrupando:** agrupa os filhotes para iniciar a amamentação;
- b) Na posição de cifose com quatro ou mais filhotes:** amamentando na posição de cifose com quatro ou mais da metade da ninhada;
- c) Outra Posição com quatro ou mais filhotes:** amamentando em outra posição com quatro ou mais da metade da ninhada;
- d) Na posição de cifose com três ou menos filhotes:** amamentando na posição de cifose com menos da metade da ninhada;
- e) Outra Posição com três ou menos filhotes:** amamentando na posição de cifose com menos da metade da ninhada;
- f) Auto limpeza materna:** limpeza na região do tórax e abdômen realizada sob a ninhada antes do início da amamentação para estimular a produção e liberação de leite (qualquer outro comportamento de autolimpeza foi desconsiderado);
- g) Limpeza da prole:** limpeza dos filhotes;
- h) Construindo o ninho:** realizando a construção do ninho.

5.6.2.4 Performance comportamental da prole

A prole masculina de camundongos foi mantida no Biotério por 30 dias para exposição aos testes comportamentais durante a fase juvenil (adolescência) ou até os 70

dias, para exposição aos testes durante a idade adulta. Na fase adulta a prole feminina de ratas também foi submetida ao teste de motivação social. Nos demais testes comportamentais foi realizada a avaliação apenas da prole masculina.

Todos os experimentos foram realizados em uma sala apropriada, sempre no período da manhã, entre as 07h15min - 12h00min, em condições de pouca luminosidade e temperatura adequada (22 ± 2 °C).

5.6.2.4.1 Avaliação da performance comportamental durante a adolescência

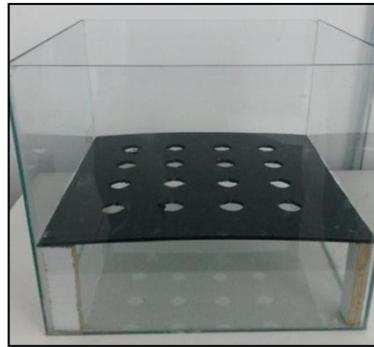
No 21° DPN foi realizado o desmame das ninhadas e as fêmeas lactantes e prole feminina (de camundongos) sacrificadas, sendo os experimentos comportamentais realizados apenas na prole masculina.

- **Teste de placa com buracos (*Hole board test*)**

No 28° DPN animais (n= 8 álcool, 12 *pair feeding* e 9 padrão) foram expostos ao teste de placa com buracos, realizado em uma arena quadrada (40 cm x 40 cm) com fundo preto e 16 buracos com três cm de diâmetro cada (Figura 08). O animal foi colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos (DOUKKALI et al., 2015). O parâmetro avaliado através da filmagem foi a quantidade de vezes em que o animal mergulhou a cabeça até o terço medial da orelha (encobrendo os olhos), nos buracos da placa. Após a exposição de cada animal ao experimento, foi realizada a limpeza do aparato com álcool 5 %.

Utilizando as imagens captadas durante a realização do teste, também foi analisado a distância percorrida (em centímetros) pelos animais, através do software *EthoVision*[®], um sistema de observação computadorizada que é capaz de realizar o rastreamento, análise e reconhecimento comportamental por meio de vídeos (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001).

Figura 08 -: Aparato do teste placa com buracos.



Fonte: Da autora

- **Avaliação do comportamento de social da brincadeira (*Play behavior*)**

Para realização do teste do comportamento de brincar no 23º DPN, a prole masculina de cada grupo experimental (n= 16 álcool, 18 *pair feeding* e 19 padrão), foi exposta a duas condições de alojamento: isolado (o filhote permaneceu sozinho na caixa moradia) ou agrupado (os filhotes permaneceram juntos na caixa moradia em número de quatro filhotes por caixa). Os animais permaneceram nestas condições até o DPN 30 (contabilizando sete dias de isolamento). Esta situação possibilitou a formação de seis grupos experimentais: prole álcool isolada, prole álcool agrupada, prole *pair feeding* isolada, prole *pair feeding* agrupada, prole padrão isolada e prole padrão agrupada.

A exposição ao teste foi realizada no DPN 30, e a escolha desta idade foi baseada em estudos que sugerem que o ápice do comportamento de brincar em roedores ocorre entre 30 e 40 dias de vida (VARLINSKAYA; SPEAR; SPEAR, 1999). Assim, no DPN 30 os animais foram expostos ao comportamento de brincar, sempre realizando o confronto de um animal isolado x um animal agrupado ambos exposto ao mesmo tratamento pré-natal. Objetivando amenizar interferências nas respostas comportamentais, durante a realização dos pareamentos foram selecionados animais com similares de peso, não confrontando irmãos consanguíneos ou que tiveram qualquer contato social prévio.

Ao fim da tarde do dia anterior aos testes, os animais foram transferidos para ambientação na sala de filmagem. A arena em que o teste foi realizado consistiu em um aparato circular, de acrílico com 30 cm de diâmetro e com o chão recoberto por aproximadamente 2 cm maravalha (Figura 09). Todos os animais expostos ao teste foram ambientados durante três dias por 10 minutos no aparato teste (27º ao 29º DPN).

No dia do teste um animal isolado foi identificado e colocado na arena teste, onde posteriormente foi inserido um animal agrupado e realizada filmagem durante 10 min. Os parâmetros analisados foram a frequência de *push* e *crawl* (o animal rasteja sobre, embaixo ou empurra na parede do aparato o outro animal), tempo farejando (tempo em segundos gasto cheirando o parceiro), tempo perseguindo (tempo em segundos perseguindo o outro animal), tempo em *grooming* social (tempo em segundos fazendo “*grooming*” em qualquer parte do corpo do parceiro) e comportamento não social (TERRANOVA; LAVIOLA, 2005). Após a exposição de cada animal ao experimento, foi realizada a limpeza do aparato com álcool 5 %.

Figura 09 - Comportamento social da brincadeira.



Fonte: Da autora.

5.6.2.4.2 Avaliação da performance comportamental durante a vida adulta

Após os DPN 70 da prole os animais foram expostos aos testes descritos a seguir:

- **Campo Aberto (*Open field*)**

O teste de campo aberto e claro-escuro são conhecidos modelos comportamentais para a avaliação da atividade locomotora e comportamentos preditivos de ansiedade.

O Campo aberto ou *Open Field*, foi realizado em uma arena circular desconhecida dos animais, com 30 cm de diâmetro, paredes de acrílico transparente e com o piso dividido em quadrantes periféricos (8) e centrais (4) (Figura 10). Ao fim da tarde do dia anterior aos testes, os animais foram transferidos para a sala de filmagem para ambientação (n= 14 álcool, 13 *pair feeding* e 14 padrão). No dia do teste, um por vez, os animais foram colocados no centro da arena e filmados por 5 minutos, sendo a filmagem posteriormente analisada quanto ao número de cruzamentos na periferia, no centro e totais, tempo de

permanência na periferia e no centro e número de *rearings* (exploração vertical) (CARNEIRO et al., 2005). Após a exposição de cada animal ao experimento, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 10: Campo aberto.

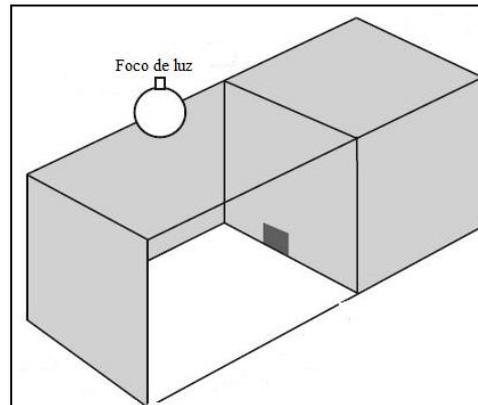


Fonte: Insight.

- **Claro-escuro (*Light-dark*)**

O aparato utilizado para realização do teste foi uma caixa dividida em dois compartimentos: um com paredes pretas e tampa escura; e um com paredes brancas e iluminação direta. Estes compartimentos são separados por uma divisória do “tipo guilhotina”, com uma porta central de 7,5 x 7,5 cm, ao nível do chão (Figura 11). Cada camundongo foi alocado individualmente no centro da parte iluminada, de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa, sendo-lhe permitido explorar livremente os dois compartimentos durante 5 minutos (n= 8 álcool, 8 *pair feeding* e 8 padrão). Desta maneira foi registrado e analisado o tempo de permanência no compartimento claro, a latência para a entrada no compartimento escuro e o número de *rearings* (exploração vertical) (DOUKKALI et al., 2015). Após a exposição de cada animal ao experimento, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 11: Esquema aparato claro-escuro.



Fonte: Adaptado de Coombs, 2014.

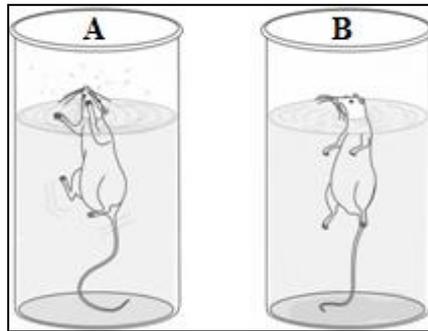
- **Nado forçado (*Forced swimming test*)**

Os testes de nado forçado e suspensão pela cauda são modelos para a avaliação de comportamentos preditivos de depressão (CASTAGNÉ et al., 2010).

Para realização do teste de Nado forçado foi utilizado um tanque cilíndrico contendo água limpa a 25°C (Figura 12). Ao fim da tarde do dia anterior ao teste, os animais foram levados para sala de filmagem para ambientação (n= 14 álcool, 12 *pair feeding* e 14 padrão). No dia do teste o animal foi transferido para o aparato e exposto a filmagem por 6 minutos. Foram analisados os últimos 4 minutos do teste.

As respostas comportamentais analisadas foram o tempo Flutuando (*Floating* - caracterizado pela ausência de movimentos bruscos, onde o animal pode apresentar somente movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água, ou permanecer boiando sobre a água), tempo nadando (*Swimming*- que engloba movimentos horizontais do animal pelo tanque, normalmente fazendo uma trajetória circular, movimentando as 4 patas vigorosamente) e o tempo escalando (*Climbing*- comportamento no qual o animal se apoia nas paredes do tanque, fazendo movimentos como se fosse escalar as mesmas). Após a filmagem de cada animal a água do cilindro foi substituída.

Figura 12: Esquema do teste de nado forçado.



Fonte: Adaptado Abelaira; Réus; Quevedo, 2013.

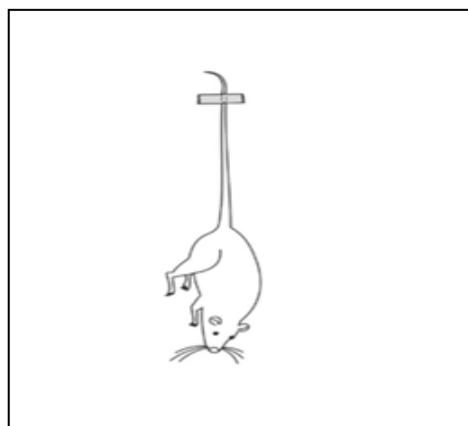
Nota: A – Animal em movimento (nadando ou escalando).

B – Animal imóvel (flutuando).

- **Suspensão pela cauda**

O teste de suspensão pela cauda foi realizado através da suspensão do animal por meio de sua cauda com o auxílio de um clipe e fita adesiva (STERU et al., 1985) (Figura 13). Após a suspensão o animal foi submetido à filmagem por 5 minutos e foram analisados parâmetros como: o registro do tempo total de imobilidade, a latência (tempo gasto entre o início do teste e o primeiro episódio de imobilidade) e o número de eventos imóveis (n= 15 álcool, 14 *pair feeding* e 15 padrão).

Figura 13- Esquema do teste de suspensão pela cauda.



Fonte: Adaptado Abelaira; Réus; Quevedo, 2013.

- **Teste de enterrar esferas (*Marble Burying*)**

O teste de enterrar esferas (*Marble Burying*) é descrito como um modelo capaz de avaliar comportamentos preditivos de ansiedade e recentemente tem sido demonstrado seu emprego com efetividade pra avaliação do comportamento compulsivo (JIMENEZ-GOMEZ; OSENTOSKI; WOODS, 2011). O teste foi realizado em uma caixa de dimensões 30 x 60 cm de cor branca leitosa, com cerca de 5 cm de serragem bem compactada. Sobre a serragem foram colocadas 24 esferas translúcidas espaçadas uniformemente (Figura 14). Cada animal foi colocado individualmente dentro da caixa com as esferas por um período de 30 minutos e a análise foi realizada pela contagem do número de esferas enterradas completamente (n= 11 álcool, 14 *pair feeding* e 16 padrão) (BADGUJAR; SURANA, 2010).

Figura 14: Teste de enterrar esfera.



Fonte: Da autora.

Nota: Caixa com aproximadamente 5 cm de serragem, contendo 24 esferas de vidro dispostas de forma equidistante.

- **Aparato de três câmaras (*Three-chamber apparatus*)**

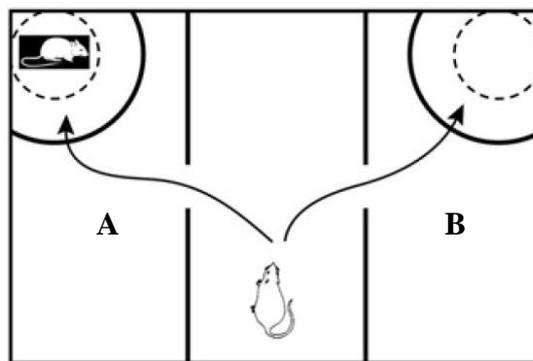
Teste utilizado para avaliar a sociabilidade ou preferência social (YANG; SILVERMAN; CRAWLEY, 2011). O teste foi realizado em uma caixa retangular, com as dimensões 60 cm (comprimento), 30 cm (largura), 40 cm (altura), dividida em três câmaras com tamanho uniforme (20 cm cada). A presença de uma porta retrátil na câmara central foi projetada para incentivar a exploração através da abertura entre as câmaras (5 cm x 10 cm) e possibilitar a abertura/fechamento manual dos compartimentos (Figura 15). No dia do teste, os animais foram transferidos para a sala de filmagem 30 minutos antes do início (n= 10 álcool, 10 *pair feeding* e 10 padrão). O experimento foi realizado em três fases: a primeira fase do teste consistiu na ambientação, onde o animal foi colocado no centro do aparato e

permaneceu por 10 minutos (primeira habituação ao aparelho), posteriormente durante a segunda fase do teste, as portas laterais do aparato foram abertas e o animal pôde explorar as três câmaras por mais 10 minutos (McFARLANE et al., 2008). Neste momento, foi avaliada uma possível falta de preferência inata pelo aparato (McFARLANE et al., 2008).

Após o período de ambientação, o animal foi novamente trancado na câmara central e um camundongo estranho aprisionado em uma gaiola de arame de 8 cm de diâmetro e colocado em umas das câmaras laterais do aparato (o aprisionamento do camundongo estranho, denominado de incentivo social, é realizado para assegurar que toda a abordagem social, foi iniciada pelo sujeito teste, e para limitar as interações de abordagem social e farejamento, evitando complicações de luta e atividade sexual entre o animal teste e o incentivo social).

Depois de alojado o incentivo social, iniciou a terceira fase do teste. As portas laterais da câmara central foram abertas, permitindo a transição e exploração do animal teste por todo o aparato e os animais foram filmados por 10 minutos. Durante a análise do vídeo foi avaliado o tempo de abordagem social: tempo no centro, tempo na câmara social (com incentivo social) e na câmara não social (sem incentivo social). Tempo cheirando câmara com incentivo social e tempo cheirando câmara sem incentivo social (explorando a cerca de 2 cm de proximidade), e tempo em auto limpeza (*self-grooming*) e número de transições entre os compartimentos do aparato. Após a exposição de cada animal ao experimento, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 15- Esquema do aparato de três câmaras.



Fonte: Adaptado de Nakatani et al., 2009.

Nota: A - Câmara Social: com incentivo social.

B - Câmara não social: vazia.

- **Teste de Motivação Sexual (*Sexual incentive motivation test*)**

O teste de motivação sexual foi realizado na prole masculina e feminina de ratas, durante a fase escura do ciclo claro-escuro (entre às 20h00min e 00h00min), sendo a sala de observação iluminada por uma lâmpada incandescente com luz vermelha escura (de aproximadamente 5 lux). No dia do teste, para ambientação os animais foram transferidos para a sala de filmagens duas horas antes do início das filmagens (18h00min).

O teste foi adaptado da metodologia proposta por Agmo (1997; 2003). O aparato no qual o teste foi realizado consistiu em um campo aberto oval (100-50 cm), cercado por parede com 45 cm de altura. As laterais da arena continham duas aberturas diagonalmente opostas, onde foram encaixadas gaiolas para o alojamento dos incentivos sexual e social (as gaiolas possuíam grades de arame que permitiam a separação do animal de incentivo do sujeito experimental) (Figura 16). Os animais utilizados como incentivos, ou “iscas”, foram: fêmea receptiva para incentivo sexual para machos ou fêmeas para incentivo social para fêmeas e macho sexualmente experiente para incentivo social para os machos ou incentivo sexual para as fêmeas. Uma área (20cm X 30 cm) fora de cada jaula dos animais incentivo foi designada como zona de incentivo do macho (ZIM) ou zona de incentivo da fêmea (ZIF).

Para tornar as fêmeas receptivas foi realizada uma cirurgia de ovariectomia sob anestesia (1ml/ 100g de tribromoetanol - TBE), cerca de três semanas antes do início dos experimentos. Os animais foram utilizados 21 dias após o procedimento, sendo este o tempo necessário para a eliminação dos hormônios circulantes (AGMO,1997). A receptividade sexual foi induzida por meio da administração 25 mg de benzoato de estradiol por via subcutânea (s.c.) cerca de 52 h antes dos testes e 1mg de progesterona (s.c.) cerca de 4 h antes dos testes. Ambos os esteroides eram da Sigma (St. Louis, MO, EUA), foram dissolvidos em solução oleosa e injetado volume de 0,2 mL / rato.

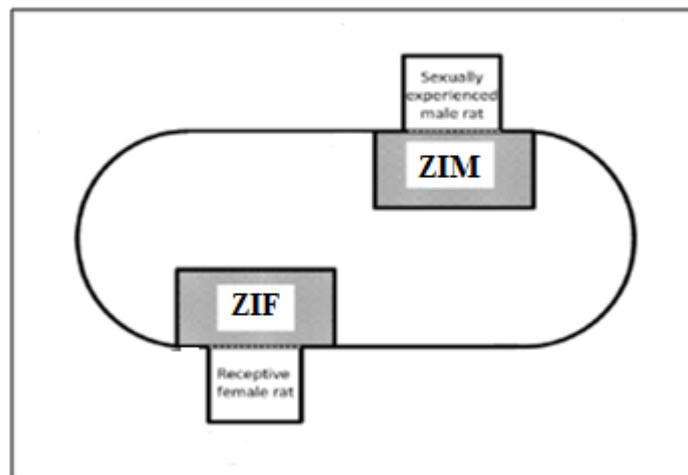
Para controle das fêmeas do grupo padrão, *pair feeding* e álcool avaliadas no teste foi realizada a coleta das secreções vaginais todos os dias (16h00min) e examinados microscopicamente. As características das quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro) do ciclo estral foram determinadas pela proporção das células epiteliais, células cornificadas e leucócitos no esfregaço vaginal. Foram selecionadas para o teste apenas fêmeas na fase de proestro.

Antes do início dos experimentos, os sujeitos foram habituados ao aparato de teste por três dias durante 10 minutos cada, sem a presença dos animais incentivo. Para o teste foram transferidos para as gaiolas acopladas na arena, as iscas (incentivos): uma fêmea receptiva e um macho sexualmente experiente. Eles foram colocados nos compartimentos contíguos à arena 20 minutos antes do início das observações dos animais testes. Após a habituação prévia

das iscas foi inserido no centro da arena o animal teste, sendo o experimento filmado por 20 minutos e posteriormente analisado. Durante o teste, o animal avaliado podia ouvir, ver e cheirar os animais de incentivo, mas devido as grade da gaiola não foram possíveis interações corporais.

Durante as análises dos vídeos os parâmetros avaliados foram: número de visitas e o tempo em segundos que os animais teste permaneciam na zona de incentivo da fêmea (ZIF) ou zona de incentivo do macho (ZIM) e o tempo na zona da fêmea ou do macho / visitas. A partir destes dados também foi calculado o escore de preferência, que consiste na razão entre o tempo de permanência na ZIF ou ZIM e o tempo total de permanência nas duas zonas de incentivo (AGMO, 1997, 2003). Após a exposição de cada animal ao experimento, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 16 - Esquema do aparato do teste de motivação sexual.



Fonte: Adaptado de Ávila et al., 2016.

Nota: As gaiolas contendo os animais de incentivo sexual ou social foram encaixadas nas laterais do aparato permitindo que estas “iscas” e os animais teste mantivessem contato visual e olfativo.

5.6.2.5 Avaliação da ativação neuronal através da marcação da proteína c-fos por imunohistoquímica

A avaliação da expressão da proteína c-Fos foi realizada nos descendentes de camundongos do grupo dieta álcool, *pair feeding* e padrão após a exposição aos testes comportamentais de comportamento social da brincadeira em animais expostos a condição de alojamento isolado (*play behavior*) ou ao teste de suspensão pela cauda.

No protocolo experimental adotado 1h30min após o término da avaliação comportamental, os animais foram anestesiados com tribromoetanol e perfundidos através de punção intracardíaca com tampão fosfato (PBS; pH 7,4) contendo 5000 U/I de heparina (50 ml) seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,1M;100 ml). Após a remoção, o encéfalo foi imerso em solução fixadora (paraformaldeído 4%) e posteriormente transferidos para solução de sacarose 30% em PBS e mantidos a 4°C até o momento da realização dos cortes. Os encéfalos foram seccionados por meio do criostato no plano coronal em 30µm de espessura e os cortes armazenados em solução *anti-freezing* a -20°C até o momento do processamento imunohistoquímico.

O processamento imunohistoquímico iniciou-se com o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 1%) por 30 minutos e posterior lavagem dos cortes (03 vezes) com tampão fosfato PBS 0,01M sob agitação. Em seguida, foi efetuado o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1M de tampão fosfato durante 01 hora e posterior incubação de 16 a 18 horas com anticorpos primários policlonais, anti-proteína c-Fos (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), diluído a 1:10000 em PBS 0,1M, contendo 2% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Ao término do período de incubação foram realizadas 3 lavagens em PBS 0,01M e realizada a incubação em solução de anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:200 por 01 hora e em seguida os cortes foram novamente lavados por 3 vezes sob agitação em PBS 0,01M. Posterior às lavagens foi realizada a incubação dos cortes com o complexo avidina-biotina peroxidase, permanecendo durante 01 hora sob agitação. Para revelação foi utilizado solução contendo 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB), peróxido de hidrogênio a 30% e intensificado com sulfato de níquel a 1% e cloreto de cobalto a 1%, o tempo de revelação foi monitorado com cronômetro digital. Após realização do procedimento foi realizada a lavagem dos cortes com PBS 0,01M para interrupção do processo.

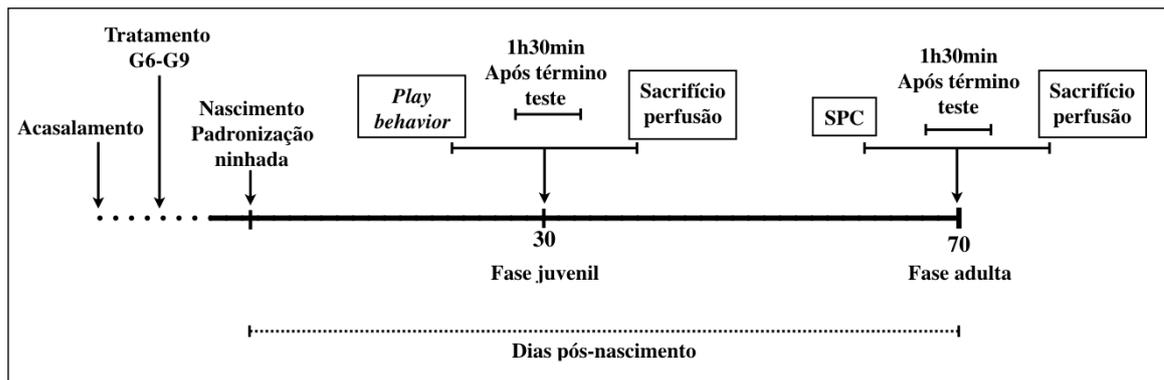
Ao fim deste processo os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secadas a temperatura ambiente, desidratados com xileno e cobertas com lamínulas fixadas por Entellan (Merck, Alemanha).

A análise da marcação das células foi visualizada por meio do microscópio Nikon H55L, sendo realizada a contagem para determinação do número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos, em uma secção por animal. A análise foi efetuada por avaliador treinado, o qual teve como referência o atlas de Paxinos e Franklin (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). As regiões avaliadas foram:

Comportamento social da brincadeira: córtex piriforme (*piriform cortex*) [Pir], córtex pré-límbico (*prelimbic cortex*) [PrL], Córtex cingulado (*cingulate cortex*) [Cg], Córtex insular agranular (*agranular insular cortex*) [AI], Amígdala lateral e basolateral (lateral and basolateral amygdaloid nucleus) [La / BLA], Amígdala central (central amygdaloid nucleus) [CeC] e Núcleo accumbens Shell (*accumbens nucleus, shell*) [AcbSh].

Suspensão pela cauda: Locus coeruleus (LC), Núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), Núcleo septal lateral (*lateral septal nucleus*) [LS], Amígdala lateral e basolateral (lateral and basolateral amygdaloid nucleus) [La / BLA], Amígdala central (central amygdaloid nucleus) [CeC] e Núcleo accumbens Shell (*accumbens nucleus, shell*) [AcbSh] e núcleo intersticial da estria terminal (*bed nucleus of the stria terminalis*) [BNST].

Figura 17- Avaliação da ativação neuronal após exposição ao teste de comportamento social da brincadeira após exposição à condição de alojamento isolado (*play behavior*) ou suspensão pela cauda (SPC).



Fonte: Da autora.

Nota: Descrição temporal da coleta do cérebro dos animais após realização do tratamento pré-natal e exposição aos testes de comportamento social da brincadeira após exposição à condição de alojamento isolado (DPN 30) ou SPC (DPN 70).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos nos diversos experimentos foi feita por meio do programa *Graph Pad Prism* versão 6.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), considerando-se, dentro de cada protocolo, sempre a coerente relação entre os grupos experimentais e seus respectivos controles. Os dados foram confrontados através dos testes estatísticos indicados para cada protocolo, sendo realizada a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo pós-teste *Newman-Keuls*. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

A seguir são apresentados os resultados obtidos no presente estudo.

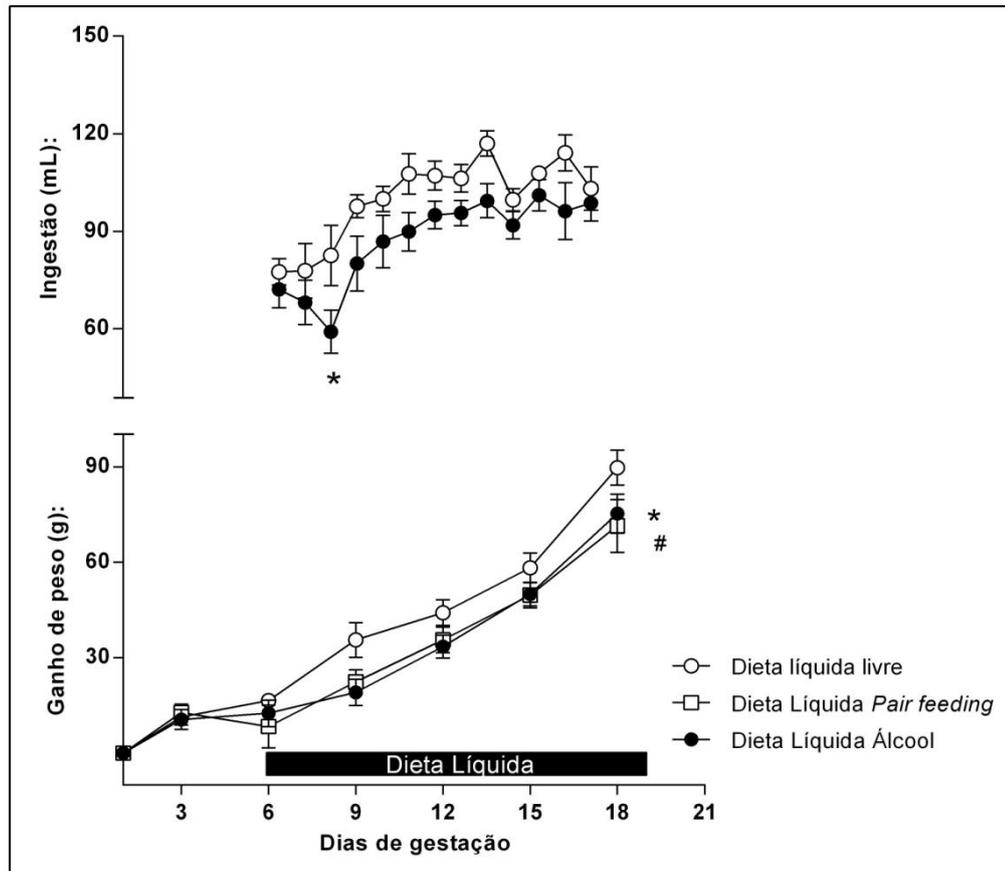
7.1 Período pré-natal

Resultados obtidos a partir de avaliação dos animais prenhes.

7.1.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL SOBRE O GANHO DE PESO E A INGESTÃO DE RATAS E CAMUNDONGOS FÊMEAS PRENHES

Como apresentado nas Figuras 18 e 19 e pelos resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* da Tabela 02, a ingestão total dos grupos álcool e *pair feeding* foi cerca de 86,2 % (em ratas) e 89,6 % (em camundongos fêmeas) do consumo pelos animais que receberam dieta líquida livremente. Também as Figuras 18 e 19 e Tabela 03, demonstram que embora o consumo dos animais tenha sido um pouco menor, não refletiu no ganho de peso dos camundongos fêmeas prenhes quando comparados os grupos dieta livre, *pair feeding* e álcool. Por sua vez, ratas prenhes apresentaram redução do ganho de peso quando comparados os grupos álcool e *pair feeding* ao grupo dieta livre, sendo este estatisticamente significativo no dia G18 ($p = 0,05$).

Figura 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a ingestão e ganho de peso de ratas prenhes.



Fonte: Da autora.

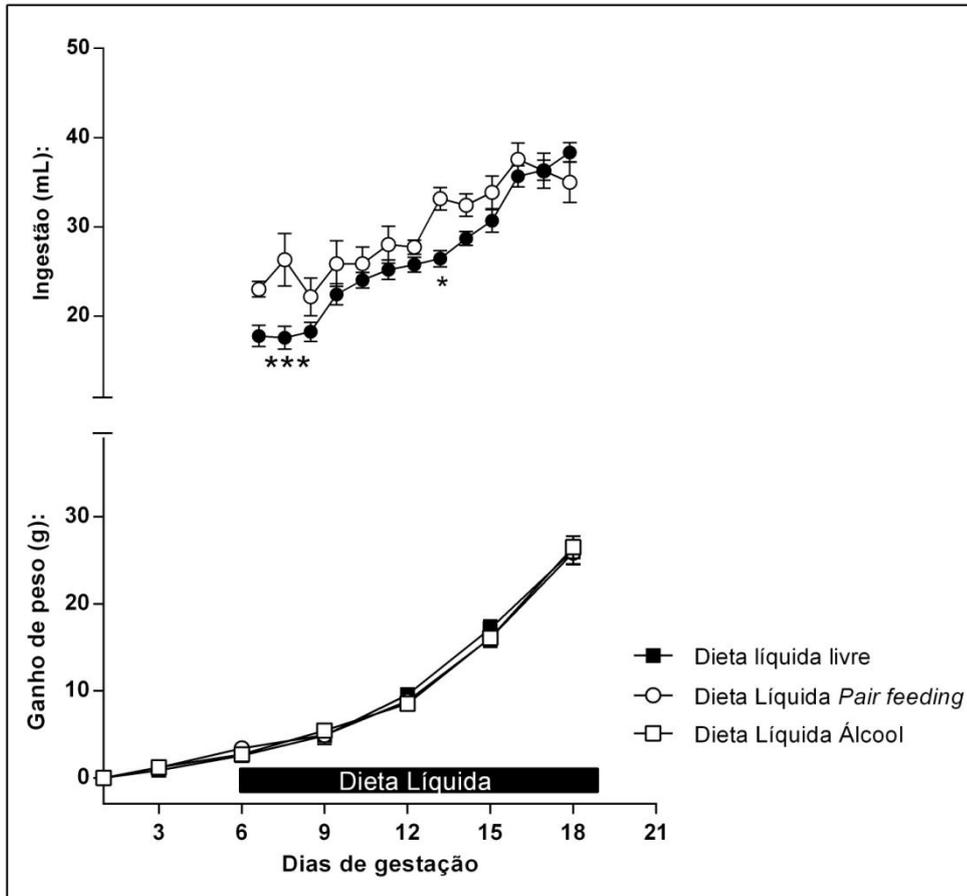
Nota: Ingestão diária de ratas prenhes submetidas ao tratamento com dieta líquida livre (n= 7) e dieta líquida acrescida de álcool (n= 9) e avaliação do ganho de peso de ratas prenhes submetidas ao tratamento com dieta líquida livre (n= 7), dieta líquida *pair feeding* (n= 6) e dieta líquida álcool (n= 9). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two way*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM. Os símbolos representam o nível de significância: * $p < 0,05$ comparado dieta líquida álcool à dieta líquida livre e # $p < 0,05$ comparado dieta líquida *pair feeding* à dieta líquida livre.

Tabela 02 - Análises de variância de duas vias do consumo de dieta líquida por ratas ou camundongos fêmeas prenhes.

INGESTÃO	Tratamento	Dias de gestação	Interação
RATAS PRENHES	$F_{1,167} = 29,84, p = 0,0001$	$F_{12,167} = 9,52, p < 0,0001$	$F_{12,167} = 0,48, p = 0,92$
CAMUNDONGOS FÊMEAS PRENHES	$F_{1,221} = 30,25, p = 0,0001$	$F_{12,221} = 34,83, p < 0,0001$	$F_{12,221} = 2,15 p = 0,01$

Fonte: Da autora.

Figura 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a ingestão e ganho de peso de camundongos fêmeas prenhes.



Fonte: Da autora.

Nota: Ingestão diária de camundongos fêmeas prenhes submetidos ao tratamento com dieta líquida livre (n= 7) e dieta líquida acrescida de álcool (n= 12) e avaliação do ganho de peso de camundongos fêmeas prenhes submetidos ao tratamento com dieta líquida livre (n= 7), dieta líquida *pair feeding* (n= 7) e dieta líquida álcool (n= 12). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two way*, seguido de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância: * p < 0,05 e *** p < 0,001 comparados os grupos dieta líquida álcool comparado dieta líquida livre.

Tabela 03 - Análise de variância de duas vias do peso de ratas ou camundongos fêmeas prenhes.

PESO	Tratamento	Dias de gestação	Interação
RATAS PRENHES	$F_{2,115} = 8,43, p = 0,0004$	$F_{6,115} = 124,1, p < 0,0001$	$F_{12,115} = 092, p = 0, 52$
CAMUNDONGOS FÊMEAS PRENHES	$F_{2,196} = 0,03, p = 0,96$	$F_{6,196} = 375,8, p < 0,0001$	$F_{12,196} = 0,24, p = 0,99$

Fonte: Da autora.

7.1.2 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO SANGUE DE RATAS E CAMUNDONGOS FÊMEAS PRENHES

Através da ingestão diária pode-se observar que o consumo médio de etanol do grupo álcool foi de aproximadamente 3,84 mL/dia para ratas prenhes e 1,29 mL/dia para camundongos fêmeas prenhes o que resultou em níveis médios de etanol no sangue de 43 e 65 mg/dL no dia gestacional 19.

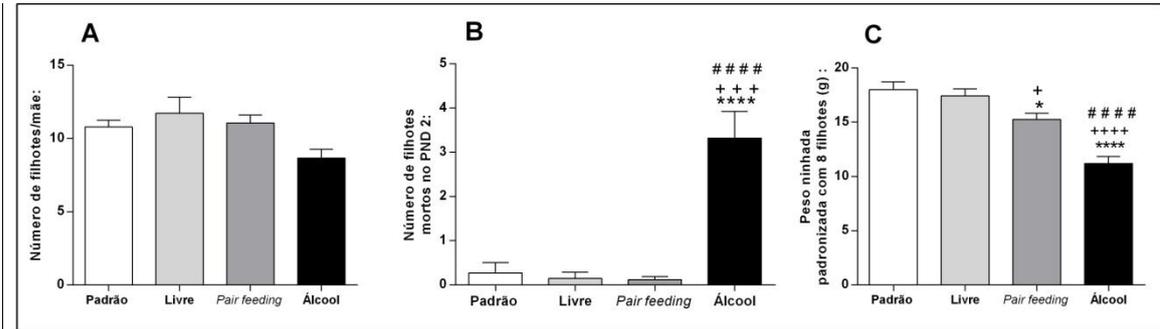
7.2 Período pós-natal

Resultados provenientes de análises realizadas após o nascimento da prole.

7.2.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE A VIABILIDADE DA PROLE DE CAMUNDONGOS NO DPN 2.

Os resultados estão representados na Figura 20 e descritos na Tabela 07 (ANEXO). Como ilustrado pela Figura 20 A, a análise ANOVA *one way* não demonstrou diferenças estatisticamente significantes no número de filhotes por mãe quando comparados os diferentes tratamentos. Pode-se observar também, que embora o tratamento não tenha alterado o número de filhotes nascidos, animais do grupo álcool apresentam maior número de filhotes mortos no DPN2 quando comparados ao grupo padrão ($p < 0,0001$), dieta livre ($p < 0,001$) e *pair feeding* ($p < 0,0001$) (Figura 20 B). Unindo-se a este resultado, a figura 20 C e a tabela 07 (ANEXO) demonstram que filhotes do grupo álcool apresentaram menor peso ao nascer no DPN2 quando comparados ao grupo padrão ($p < 0,0001$), dieta livre ($p < 0,0001$) e *pair feeding* ($p < 0,0001$). Filhotes do grupo *pair feeding* também apresentaram redução do peso ao nascer no DPN2 quando comparados ao grupo padrão ($p < 0,05$) e dieta livre ($p < 0,05$) (Figura 20 C).

Figura 20 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a viabilidade da prole de **camundongos** no DPN2.



Fonte: Da autora

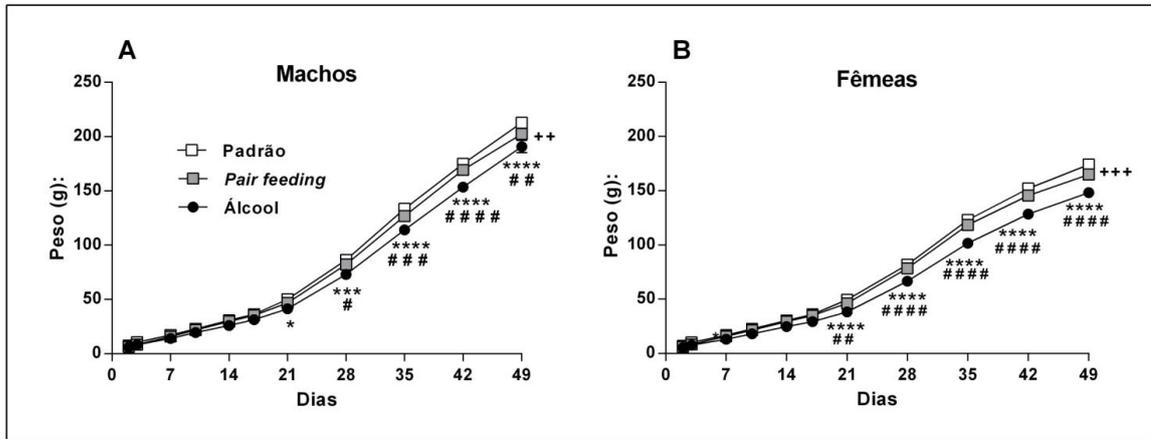
Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 07 do apêndice. Os símbolos representam o nível de significância: * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo padrão; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$ e ++++ $p < 0,0001$ comparado ao grupo dieta livre; # # # # $p < 0,0001$ comparado ao grupo *pair feeding*.

7.2.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O PESO CORPORAL, DISTÂNCIA NASOANAL E ÍNDICE ANOGENITAL DOS FILHOTES MACHOS E FÊMEAS DE RATAS

A Figura 21 e a Tabela 08 (APÊNDICE) demonstram que filhotes machos expostos durante a vida intrauterina ao álcool apresentaram redução no peso corporal. A realização da análise de múltiplas comparações demonstrou diferenças significativas nos filhotes machos do grupo álcool quando comparados ao *pair feeding* ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$; Fig. 21 A) e padrão ($p < 0,05$, $p < 0,001$, e $p < 0,0001$; Fig. 21 A). A análise dos filhotes fêmeas tratados na vida intrauterina com álcool também apontou redução do peso corporal. O pós-teste *Newman-Keuls*, demonstrou diferenças significativas que se iniciaram no DPN 21 e permaneceram até o DPN 49, quando comparado à prole do grupo álcool aos filhotes de ratas do grupo *pair feeding* ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, Fig. 21 B) e padrão ($p < 0,0001$, Fig. 21 B). Também foram observadas diferenças no DPN 49, quando comparados machos e fêmeas do grupo *pair feeding* ao padrão ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, Fig. 21 A e B).

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* do peso corporal da prole masculina e feminina estão descritos na Tabela 04.

Figura 21 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o peso corporal dos filhotes machos e fêmeas de ratas.



Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico (A) Filhotes machos e (B) Filhotes fêmeas. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 08 do apêndice. Os símbolos representam o nível de significância: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado padrão ao álcool; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparado *pair feeding* ao álcool; ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado padrão ao *pair feeding*.

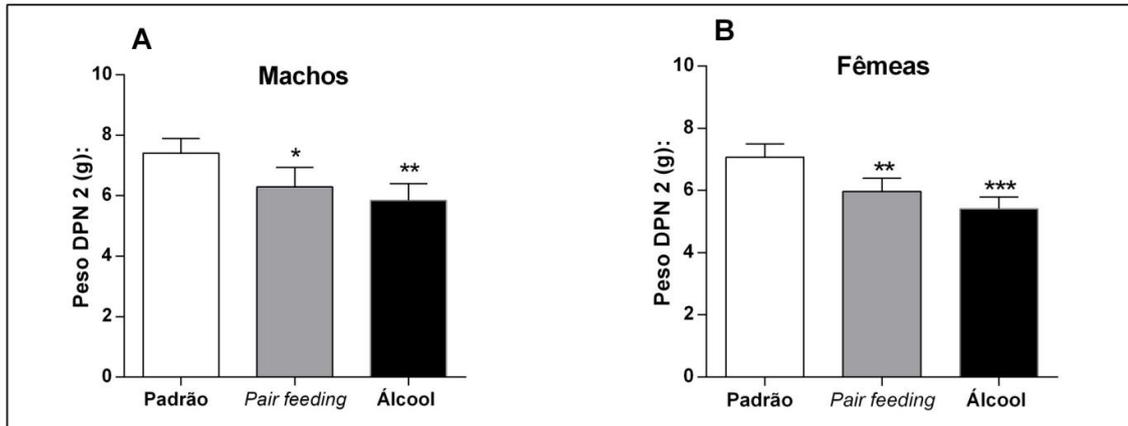
Tabela 04 - Análise de variância de duas vias do peso corporal da prole de ratas.

PROLE	Tratamento	Dias	Interação
MACHOS	$F_{2,121} = 44,79; p < 0,0001$	$F_{10,121} = 2216; p < 0,0001$	$F_{20,121} = 2,93; p = 0,0001$
FÊMEAS	$F_{2,121} = 107,0; p < 0,0001$	$F_{10,121} = 2605; p < 0,0001$	$F_{20,121} = 6,43; p < 0,0001$

Fonte: Da autora.

A avaliação do peso no DPN2 de filhotes machos ($F_{2,11} = 10,45; p = 0,002$) e fêmeas ($F_{2,11} = 21,31; p = 0,0002$) do grupo álcool e *pair feeding* também apresentou-se significativamente reduzida quando comparados ao grupo padrão (Figura 22 A e B, Tabela 08 – APÊNDICE).

Figura 22- Efeitos da exposição pré- natal ao álcool sobre o peso ao nascer (DPN 2) da prole de ratas.



Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico (A) Filhotes machos e (B) Filhotes fêmeas. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 08 do apêndice. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo padrão.

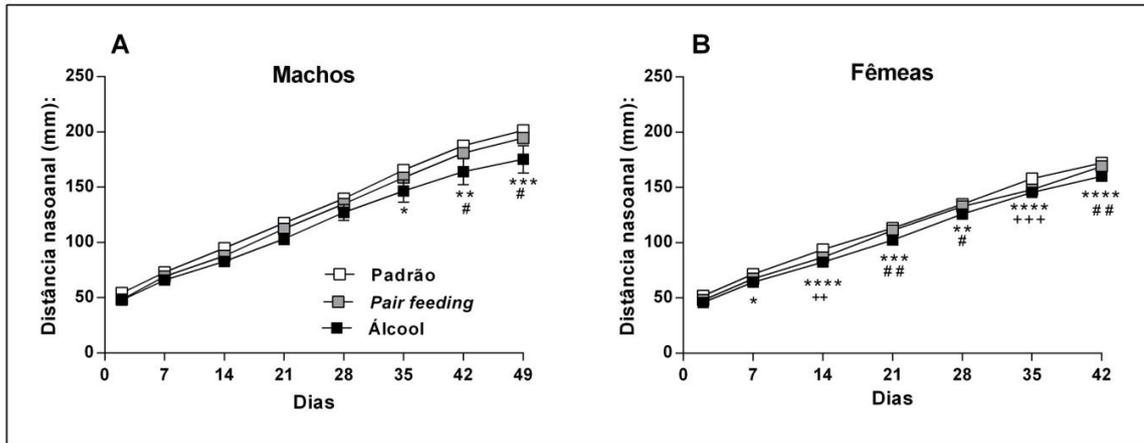
Conforme apresentado na Figura 23 A e B e descrito pela Tabela 09 (APÊNDICE), foi observada redução da distância nasoanal dos filhotes machos e fêmeas. O pós-teste *Newman-Keuls*, demonstrou diferenças estatisticamente significativas quando comparados filhotes machos e fêmeas de ratas do grupo álcool ao *pair feeding* ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, Fig. 23 A e B) e padrão ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, Fig. 23 A e B) e animais do grupo *pair feeding* quando comparados ao grupo padrão ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* do peso corporal da prole masculina e feminina estão descritos na Tabela 05.

Tabela 05 - Análise de variância de duas vias da distância nasoanal da prole de ratas.

PROLE	Tratamento	Dias	Interação
MACHOS	$F_{2,88} = 18,88$; $p < 0,0001$	$F_{7,88} = 293,5$; $p < 0,0001$	$F_{14,88} = 0,62$; $p < 0,83$
FÊMEAS	$F_{2,77} = 54,26$; $p < 0,0001$	$F_{6,77} = 1674$; $p < 0,0001$	$F_{12,77} = 1,13$; $P = 0,34$

Fonte: Da autora.

Figura 23 - Efeitos da exposição pré- natal ao álcool sobre a distância nasoanal da prole de ratas.

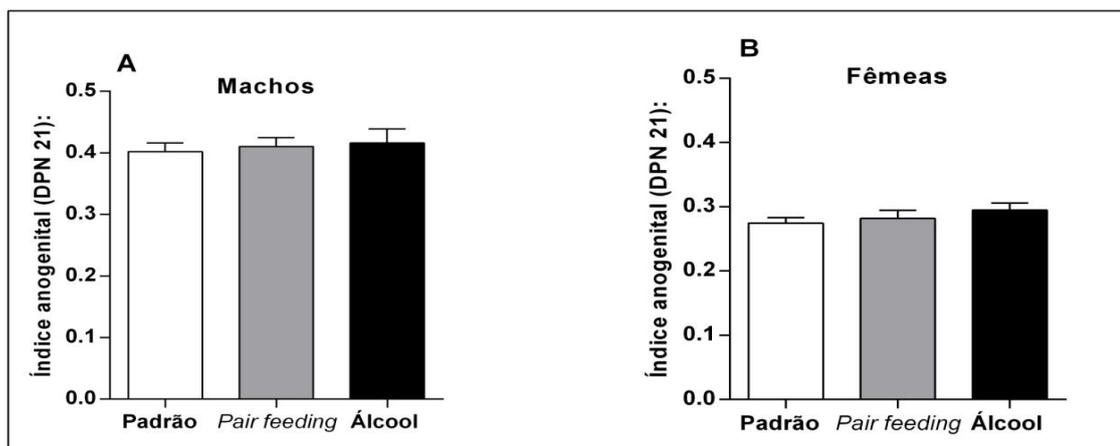


Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 09 do apêndice. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,001$ quando comparado tratamento padrão ao álcool; # $p < 0,05$ ou ## $p < 0,01$ quando comparado *pair feeding* ao álcool; ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado tratamento padrão ao *pair feeding*.

A análise estatística do índice anogenital no DPN 21 de machos não demonstrou significância ($F_{2,11} = 0,15$; $p < 0,85$), quando comparado aos grupos padrão e *pair feeding*. Em fêmeas, também não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($F_{2,11} = 0,98$; $p < 0,40$) quando comparado aos grupos padrão e *pair feeding* (Figura 24 A e B e Tabela 10 em APÊNDICE).

Figura 24 - Efeitos da exposição pré- natal ao álcool sobre o índice anogenital no DPN 21 da prole de ratas.



Fonte: Da autora.

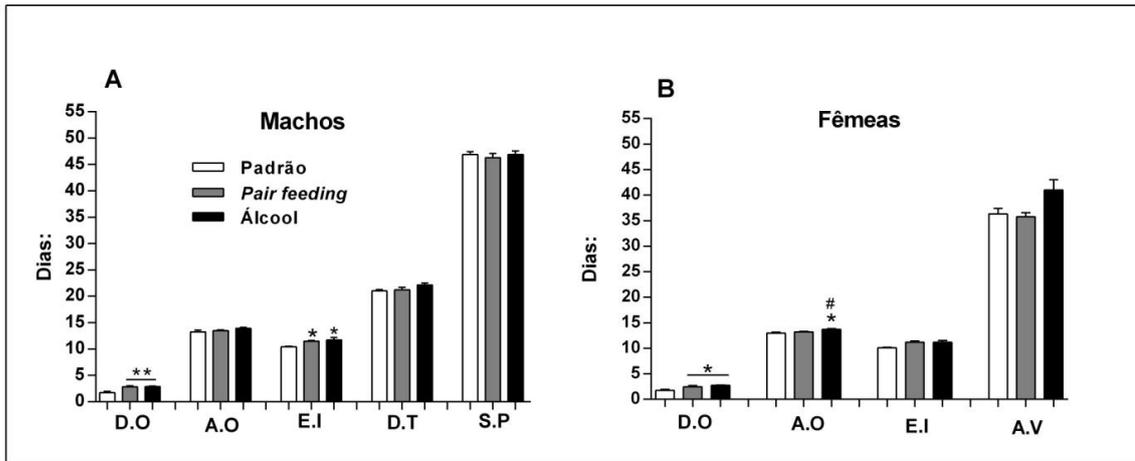
Nota: Índice anogenital no DPN 21 de filhotes de ratas submetidas no período pré-natal ao tratamento com álcool, dieta *pair feeding* e padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 10 do apêndice.

7.2.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO E REFLEXO DA PROLE

Conforme ilustrado graficamente pela Figura 25 e descrito pela Tabela 11 (APÊNDICE), a análise estatística ANOVA *one way*, demonstra que o desdobramento da orelha ocorreu atrasado em filhotes machos ($F_{2,12} = 11,29$; $p = 0,001$) e fêmeas ($F_{2,12} = 6,46$; $p = 0,01$) dos grupos álcool e dieta *pair feeding* quando comparados ao grupo padrão. O dia da abertura ocular nos filhotes machos não apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparados animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding* e padrão ($F_{2,12} = 1,83$; $p = 0,20$). Divergindo deste resultado, a avaliação dos filhotes fêmeas do grupo álcool demonstrou atraso na abertura dos olhos quando confrontados os resultados com os filhotes do grupo *pair feeding* e padrão ($F_{2,12} = 5,93$; $p = 0,01$).

Ainda na Figura 25 e Tabela 11 (APÊNDICE) o dia de erupção dos incisivos superiores de filhotes machos ($F_{2,12} = 5,32$; $p = 0,02$) do grupo álcool e *pair feeding* apresentou-se atrasada quando comparada aos resultados do grupo padrão ($p < 0,05$, Fig. 25 A). A prole feminina não apresentou atraso no dia de erupção dos incisivos superiores quando comparados os grupos álcool, *pair feeding* e padrão ($F_{2,12} = 2,43$; $p = 0,06$). Também não foram encontrados resultados estatisticamente significantes durante a avaliação da descida testicular ($F_{2,11} = 3,20$; $p = 0,08$) e separação prepucial ($F_{2,11} = 0,27$; $p = 0,76$) em filhotes machos e abertura vaginal ($F_{2,11} = 3,96$; $p = 0,06$) nos filhotes fêmeas.

Figura 25 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento físico da prole de ratas.



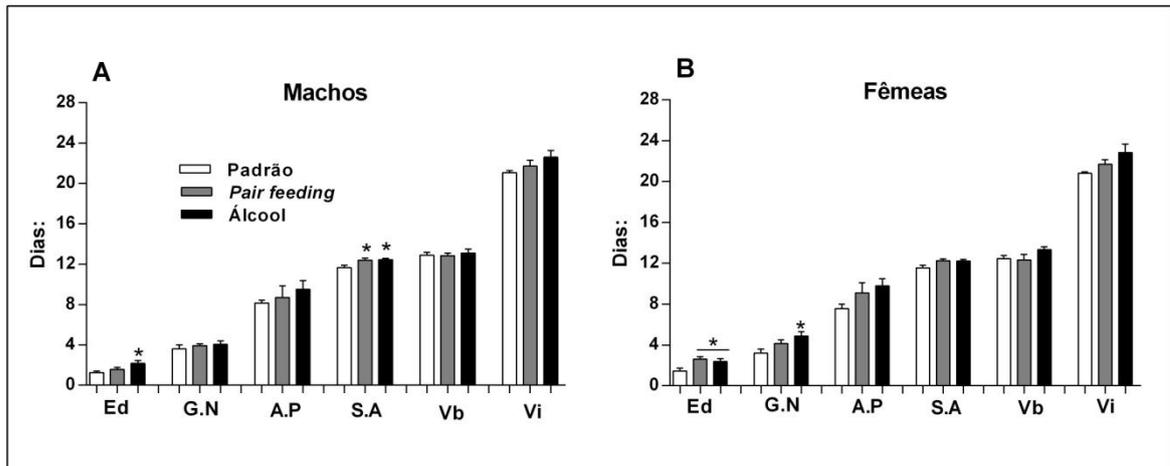
Fonte: Da autora.

Nota: Parâmetros de desenvolvimento físico de filhotes machos (A) e fêmeas (B) de ratas submetidas no período pré-natal ao tratamento com álcool, dieta *pair feeding* e padrão. Os gráficos apresentam o tempo em dias necessários para atingir cada parâmetro analisado: **D.O.** (desdobramento das orelhas); **A.O.** (abertura dos olhos); **E.I.** (erupção dos incisivos); **D.T.** (descida dos testículos); **S.P.** (separação prepucial) e **A.V.** (abertura vaginal). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 11 do apêndice. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado tratamento padrão; # $p < 0,05$ quando comparado ao tratamento *pair feeding*.

A Figura 26 A e B e Tabela 12 (APÊNDICE) apresentam os resultados da avaliação dos parâmetros relacionados ao desenvolvimento reflexo da prole. Pode-se observar que filhotes machos do grupo álcool ($F_{2,12} = 3,77$; $p = 0,05$) e fêmeas do grupo álcool e *pair feeding* ($F_{2,12} = 5,44$; $p = 0,02$) apresentaram atraso no dia de identificação do reflexo de endireitar quando comparados ao grupo padrão. A avaliação da geotaxia negativa revelou que filhotes fêmeas de mães tratadas com álcool apresentaram atraso neste reflexo quando comparadas ao grupo padrão ($F_{2,12} = 4,37$; $p = 0,03$, Fig. 26 B). Divergindo deste resultado, filhotes machos não apresentaram alteração na geotaxia negativa quando realizada comparação entre os grupos ($F_{2,12} = 0,53$; $p = 0,59$).

Ainda na Figura 26 A e B e Tabela 12 (APÊNDICE), o dia de identificação do susto auditivo de filhotes machos ($F_{2,12} = 5,47$; $p = 0,02$) do grupo álcool e *pair feeding* apresentou-se atrasado quando comparada aos resultados do grupo padrão ($p < 0,05$, Fig. 26 A). Filhotes fêmeas não apresentaram alteração no dia de susto auditivo quando comparados os grupos álcool, *pair feeding* e padrão ($F_{2,12} = 3,35$; $p = 0,06$, Fig. 26 B). Também não foram encontrados resultados estatisticamente significativos durante a avaliação da sensibilidade das vibrissas em machos ($F_{2,11} = 0,18$; $p = 0,83$, Fig. 26 A) e fêmeas ($F_{2,11} = 0,19$; $p = 0,19$, Fig. 26 B) e acuidade visual de machos ($F_{2,11} = 2,30$; $p = 0,14$, Fig. 26 A) e fêmeas ($F_{2,11} = 3,49$; $p = 0,06$, Fig. 26 B).

Figura 26 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento reflexo da prole de ratas.



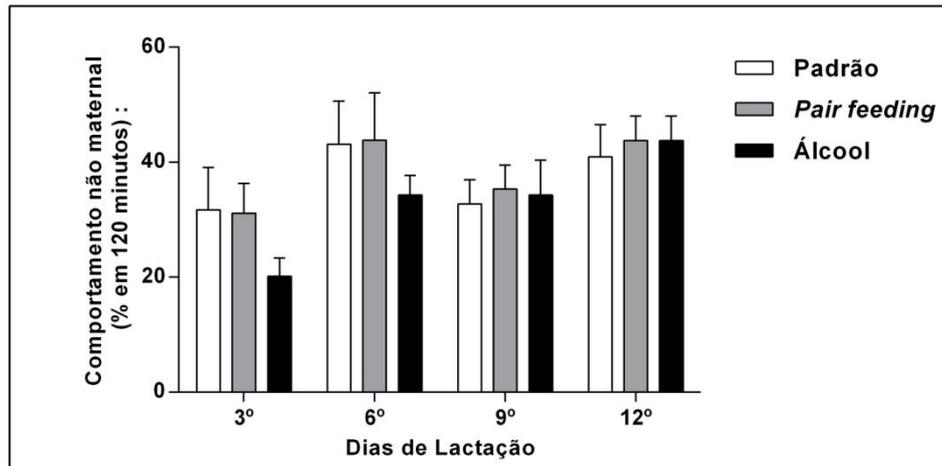
Fonte: Da autora.

Nota: Parâmetros de desenvolvimento físico de filhotes de ratas submetidas no período pré-natal ao tratamento com álcool, dieta *pair feeding* e padrão. Os gráficos apresentam o tempo em dias necessários para atingir cada parâmetro analisado: **Ed** (reflexo de endireitar); **G.N** (geotaxia negativa); **A.P** (apreensão palmar); **S.A** (susto auditivo); **Vb** (sensibilidade das vibrissas); **Vi** (acuidade visual). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 12 do apêndice. * $p < 0,05$ quando comparado tratamento padrão.

7.2.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO DOS CAMUNDONGOS FÊMEAS

A porcentagem de observações em 120 minutos em que o camundongo fêmea lactante desempenhou ou não parâmetros relacionados ao cuidado com a prole é ilustrado graficamente pelas Figuras 27 e 28 e descrito nas Tabelas 13 e 14 (APÊNDICE). A análise estatística de escolha para o teste foi a ANOVA *one way*, seguida de pós-teste *Newman-Keuls*, pois embora os dados sejam apresentados juntos nos diferentes dias, o objetivo da análise foi comparar as alterações entre os diferentes tratamentos no mesmo dia, e não entre os vários dias de análise. Como observado, os resultados demonstram a ausência de alterações significativas no comportamento não materno e nos comportamentos maternos quando comparados animais do grupo álcool, *pair feeding* e padrão durante o 3º, 6º, 9º ou 12º dias de lactação.

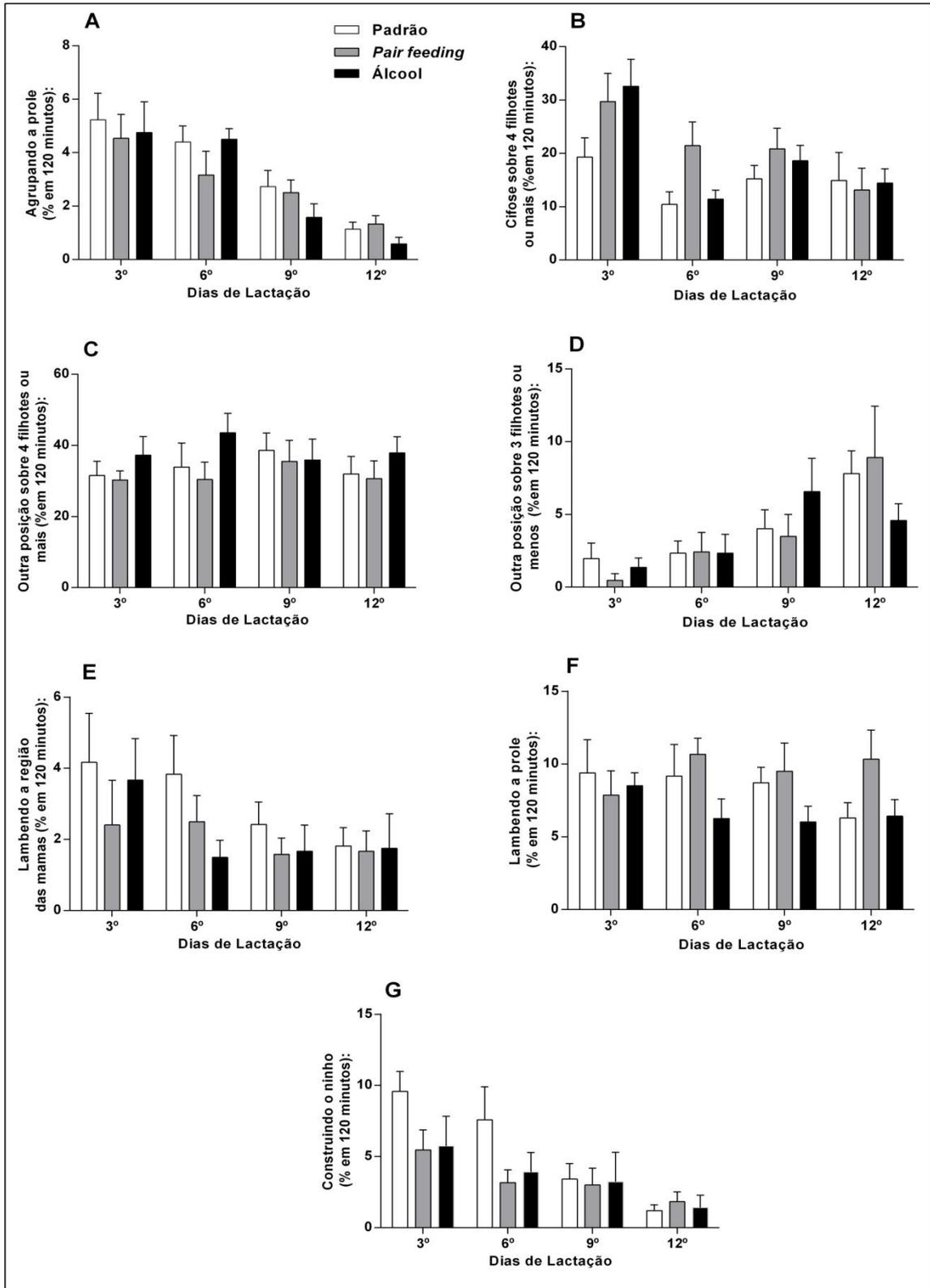
Figura 27 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento não materno dos **camundongos fêmeas** lactantes.



Fonte: Da autora.

Nota: Comportamento não materno durante o 3º, 6º, 9º e 12º dias de lactação. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 13 do apêndice.

Figura 28 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento materno dos **camundongos fêmeas lactantes**.



Fonte: Da autora.

Nota: Grupo álcool (n=10), pair feeding (n=9) e padrão (n=11). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one way, seguidos de pós-teste Newman-Keuls, com valores expressos como média ± EPM e detalhados na tabela 14 do apêndice.

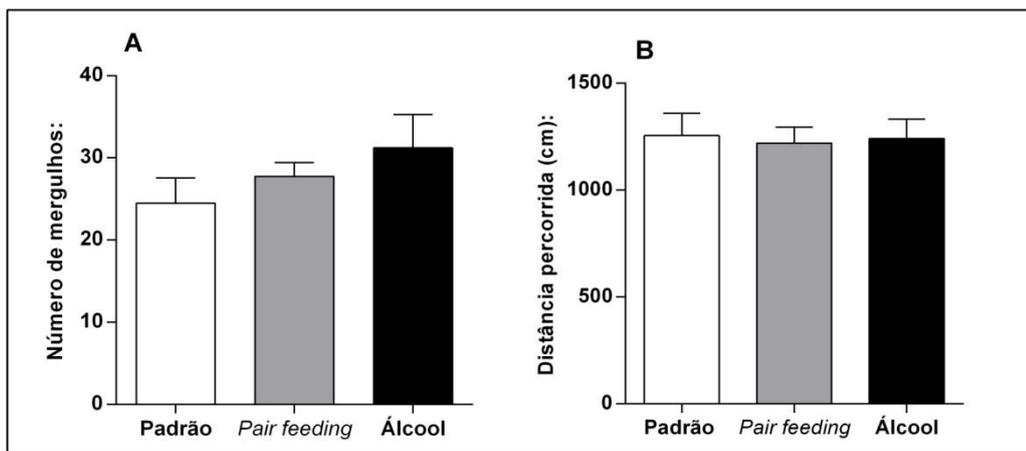
7.2.5 PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DA PROLE

A seguir são apresentados os resultados obtidos das respostas comportamentais avaliadas na adolescência e vida adulta da prole.

7.2.5.1 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de *camundongos* no teste de placa com buracos durante a adolescência

Conforme apresentado graficamente pela Figura 29 e descrito na Tabela 15 (APÊNDICE) a análise estatística não demonstrou alterações significativas no número de vezes que os animais mergulham a cabeça nos buracos ($p = 0,30$) e na distância percorrida ($p = 0,95$) após avaliação do Teste de placa com buracos.

Figura 29 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento da prole masculina de **camundongos** durante a adolescência no teste de placa com buracos.



Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste Newman-Keuls, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 15 do apêndice.

7.2.5.2 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de *camundongos* no comportamento social da brincadeira durante a adolescência.

A Tabela 06 com os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way*, a ilustração gráfica 30 e a Tabela 16 (APÊNDICE), apresentam a influência da exposição

pré-natal ao álcool sobre o comportamento de brincar da prole masculina. Com relação ao parâmetro de *push e crawl* o pós-teste *Newman-Keuls* demonstra que animais do grupo álcool mantidos na condição de alojamento agrupada não apresentaram alterações significativas quando comparado ao grupo *pair feeding* e padrão agrupados ($p > 0,05$, Fig. 30 A). Contudo, quando comparado animais em condição de alojamento isolada e animais agrupados, observa-se que animais *pair feeding* e padrão isolados, apresentam aumento da frequência de *push e crawl*, quando comparados ao grupo padrão, *pair feeding* e álcool agrupados ($p < 0,0001$, Fig. 30 A). Por sua vez, animais do grupo álcool isolados apresentaram redução da frequência de *push e crawl* em comparação a animais do grupo padrão e *pair feeding* isolados ($p < 0,0001$, Fig. 30 A). Além disso, não foram encontradas diferenças estatísticas quando comparados animais agrupados (álcool, *pair feeding* e padrão) com animais do grupo álcool isolados ($p > 0,05$, Fig. 30 A).

A avaliação do teste de múltiplas comparações do tempo perseguindo (Figura 30 B) demonstrou que animais isolados do grupo padrão e *pair feeding* apresentaram aumento do tempo perseguindo quando comparados aos animais agrupados do grupo padrão ($p < 0,0001$), *pair feeding* ($p < 0,001$) e álcool ($p < 0,001$) (Figura 30 B). Animais do grupo álcool mantidos na condição de alojamento agrupada não apresentaram alterações significativas quando comparado ao grupo *pair feeding* e padrão agrupados ($p > 0,05$, Fig. 30 B). Além disso, o pós-teste *Newman-Keuls* demonstra que animais do grupo álcool isolados apresentaram redução do tempo perseguindo quando comparados a animais do grupo padrão e *pair feeding* isolados ($p < 0,05$, Fig. 30 B). Não foram encontradas diferenças estatísticas quando comparados animais agrupados (álcool, *pair feeding* e padrão) com animais do grupo álcool isolados ($p > 0,05$, Fig. 30 B).

Quando avaliado o tempo farejando (Figura 30 C) o pós-teste *Newman-Keuls* demonstra a ausência de alterações estatísticas entre os animais do grupo *pair feeding* e padrão agrupados, quando comparados entre si ($p < 0,05$). Por outro lado, animais agrupados álcool apresentaram aumento do tempo farejando quando comparados a animais agrupados padrão ($p < 0,05$) e *pair feeding* ($p < 0,01$) (Figura 30 C). Também foram encontradas alterações estatísticas quando realizada a comparação entre animais agrupados padrão ($p < 0,001$, Fig. 30 C) e *pair feeding* ($p < 0,0001$, Fig. 30 C) com animais isolados dos grupos padrão, *pair feeding* e álcool. Nenhuma alteração foi observada quando comparados animais agrupados do grupo álcool com animais isolados dos grupos padrão, *pair feeding* e álcool ($p < 0,05$, Fig. 30 C).

Ainda na Tabela 06, ilustração gráfica 30 D e Tabela 16 (APÊNDICE) a análise pelo pós-teste *Newman-Keuls* do tempo de *grooming* social demonstra que animais do grupo álcool mantidos na condição de alojamento agrupada não apresentaram alterações significativas quando comparado ao grupo *pair feeding* e padrão agrupados ($p > 0,05$). Já animais padrão isolados, apresentam aumento do tempo de *grooming* social, quando comparados ao grupo padrão, *pair feeding* e álcool agrupados ($p < 0,05$; Fig. 30 D). Por sua vez, animais do grupo álcool isolados apresentaram redução do tempo de *grooming* social em comparação a animais do grupo padrão isolados ($p < 0,05$; Fig. 30 D). Nenhuma diferença estatística foi encontrada no comportamento não social dos animais (Figura 30 E) quando avaliado os tratamentos, as condições de alojamento e a interação destas variáveis ($p > 0,05$).

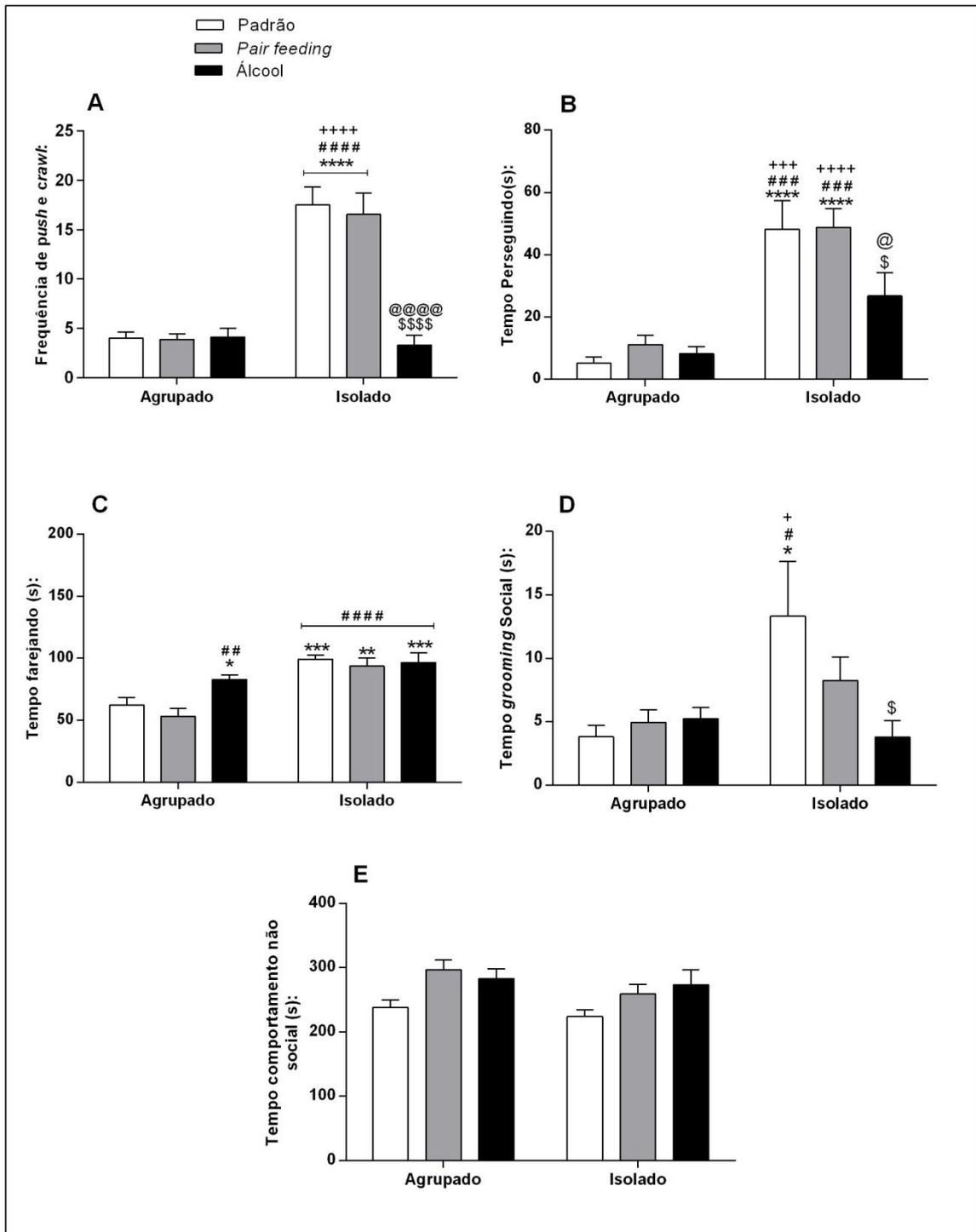
Tabela 06 – Análise de variância de duas vias do comportamento social da brincadeira durante a adolescência da prole masculina de *camundongos*.

Parâmetro	Tratamento	Alojamento	Interação
<i>Crush/crawl</i>	$F_{2,45} = 17,18; p < 0,0001$	$F_{1,45} = 60,51; p < 0,0001$	$F_{2,45} = 18,10; p < 0,0001$
<i>Tempo perseguindo</i>	$F_{2,45} = 2,58; p < 0,08$	$F_{1,45} = 50,12; p < 0,0001$	$F_{2,45} = 2,47; p < 0,09$
<i>Tempo farejando</i>	$F_{2,45} = 3,87; p < 0,02$	$F_{1,45} = 39,06; p < 0,0001$	$F_{2,45} = 3,02; p < 0,05$
<i>Tempo de grooming social</i>	$F_{2,45} = 1,92; p < 0,15$	$F_{1,45} = 5,19; p < 0,02$	$F_{2,45} = 3,54; p < 0,03$
<i>Comportamento não social</i>	$F_{2,45} = 1,26; p < 0,21$	$F_{1,45} = 2,42; p < 0,12$	$F_{2,45} = 0,44; p < 0,64$

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais dieta padrão (16 = 8 isolados e 8 agrupados), *pair feeding* (17 = 9 isolados e 9 agrupados) e álcool (16 = 9 isolados e 8 agrupados). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA two way.

Figura 30 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento social da brincadeira durante a adolescência da prole masculina de **camundongos**



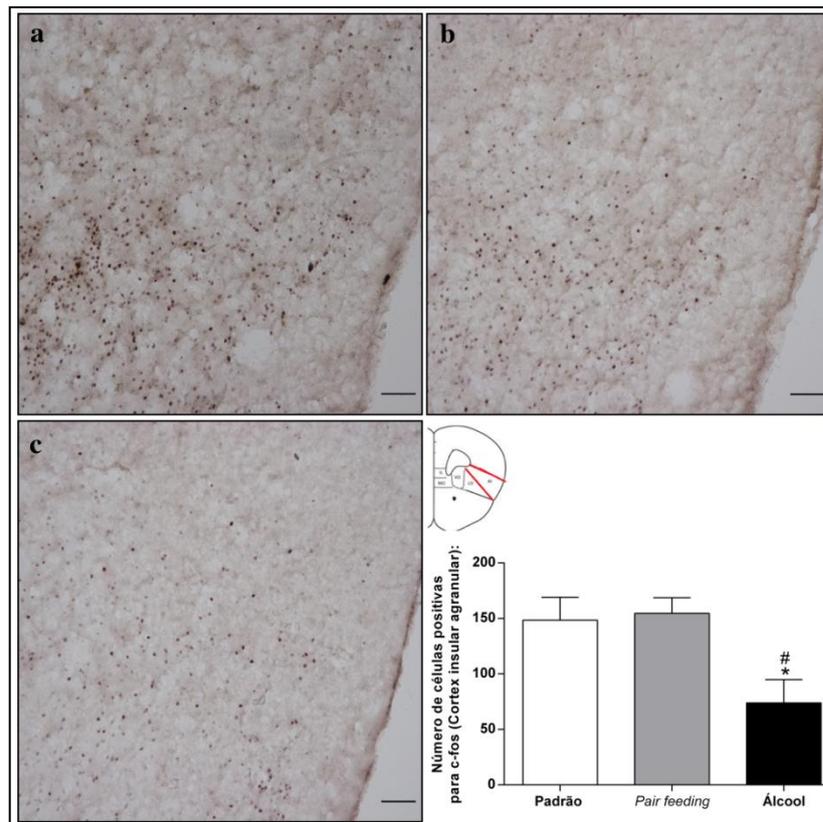
Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *two way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 16 do apêndice. Os símbolos representam a presença de diferenças estatísticas: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 quando comparado ao padrão agrupado; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,0001 quando comparado ao *pair feeding* agrupado; + p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001, ++++ p<0,0001 quando comparado ao álcool agrupado; \$ p<0,05, \$\$\$ p<0,0001 quando comparado ao padrão isolado e @ p<0,05, @@@ p<0,0001 quando comparado ao *pair feeding* isolado.

7.2.5.3 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de camundongos

Conforme apresentado pelas Figuras e Tabela 17 (APÊNDICE), animais filhos de mães expostas ao álcool durante a gestação apresentaram redução significativa no número de células positivas para c-fos no AI ($p = 0,014$; Fig. 31), Pir ($p = 0,0006$; Fig. 32), Cg ($p = 0,0072$; Fig. 33) e AcbSh ($p = 0,0003$; Fig. 34), quando comparados ao grupo padrão e *pair feeding*. Também ocorreu redução da ativação neuronal no PrL ($p = 0,05$, Fig. 35) dos animais do grupo álcool quando comparados ao grupo padrão. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na amígdala lateral ($p = 0,33$) e central ($p = 0,68$) quando realizada comparação entre os grupos.

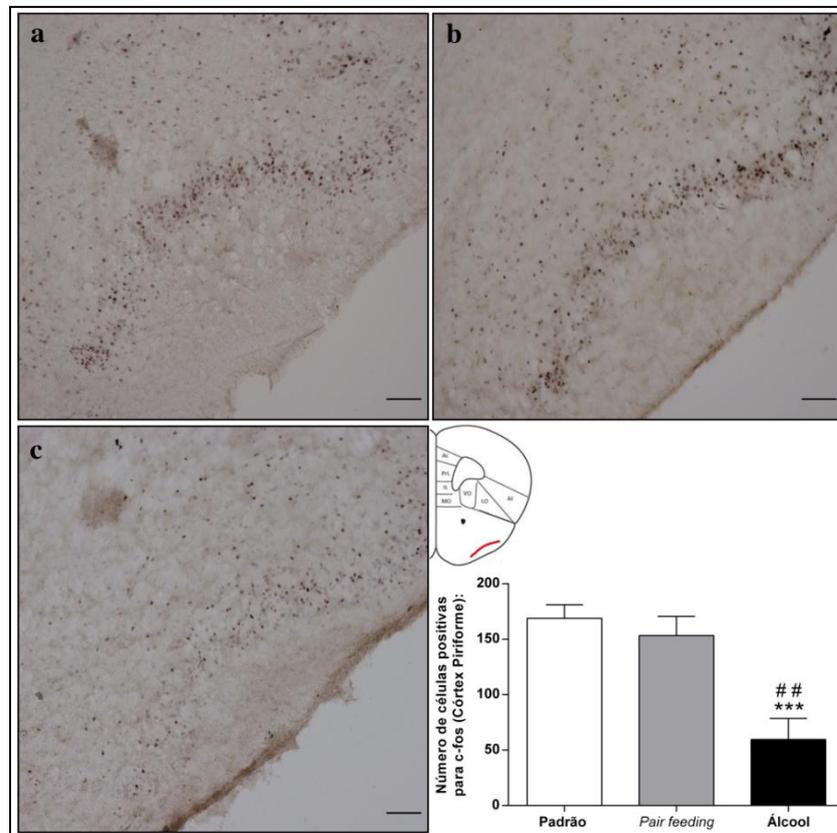
Figura 31 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no AI.



Fonte: Da autora.

Nota: Fotomicrografias de cortes do encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM ($n = 04-07$ animais por grupo) e detalhados na tabela 17 do apêndice. As barras representam $100\mu\text{m}$, foto com aumento de $10\times$. Os símbolos representam o nível de significância: * $p < 0,05$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; # $p < 0,05$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

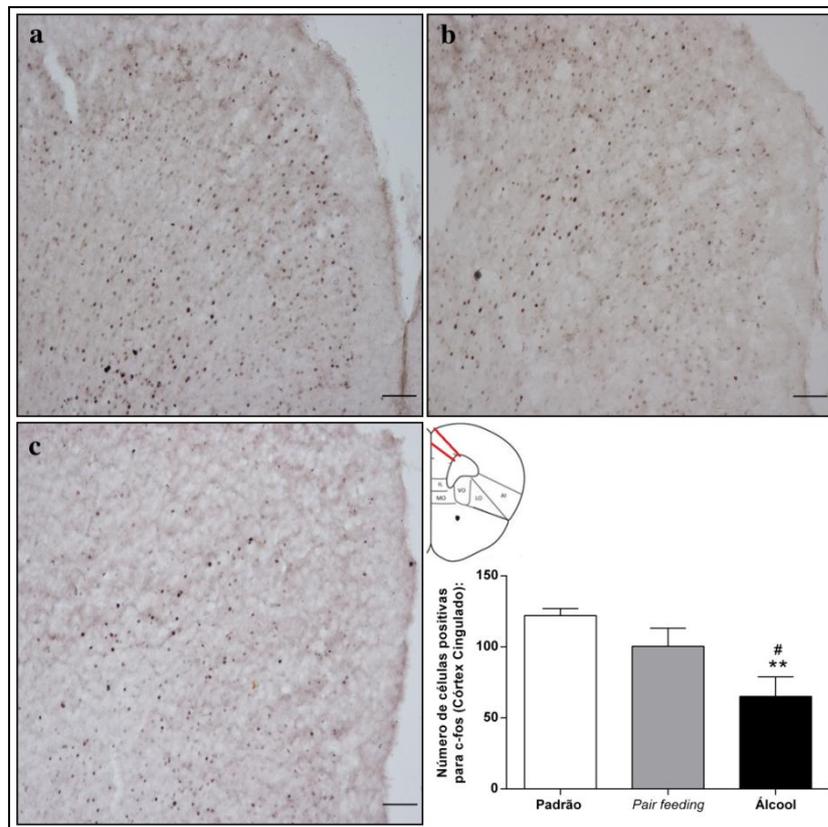
Figura 32 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no Pir.



Fonte: Da autora.

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes d encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 04-07 animais por grupo) e detalhados na tabela 17 do apêndice. As barras representam 100 μ m, foto com aumento de 10x. Os símbolos representam o nível de significância: *** $p < 0,001$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; ## $p < 0,01$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

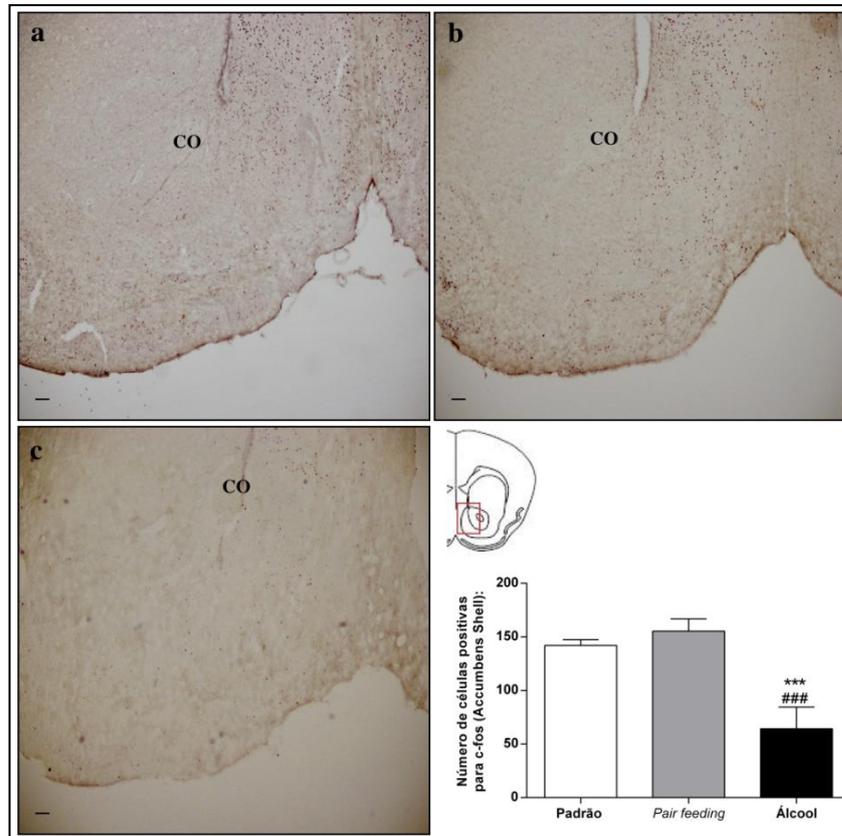
Figura 33 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no Cg.



Fonte: Da autora.

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes d encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 04-07 animais por grupo e detalhados na tabela 17 do apêndice. As barras representam 100 μ m, foto em aumento de 10 x. Os símbolos representam o nível de significância: ** $p < 0,01$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; # $p < 0,05$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

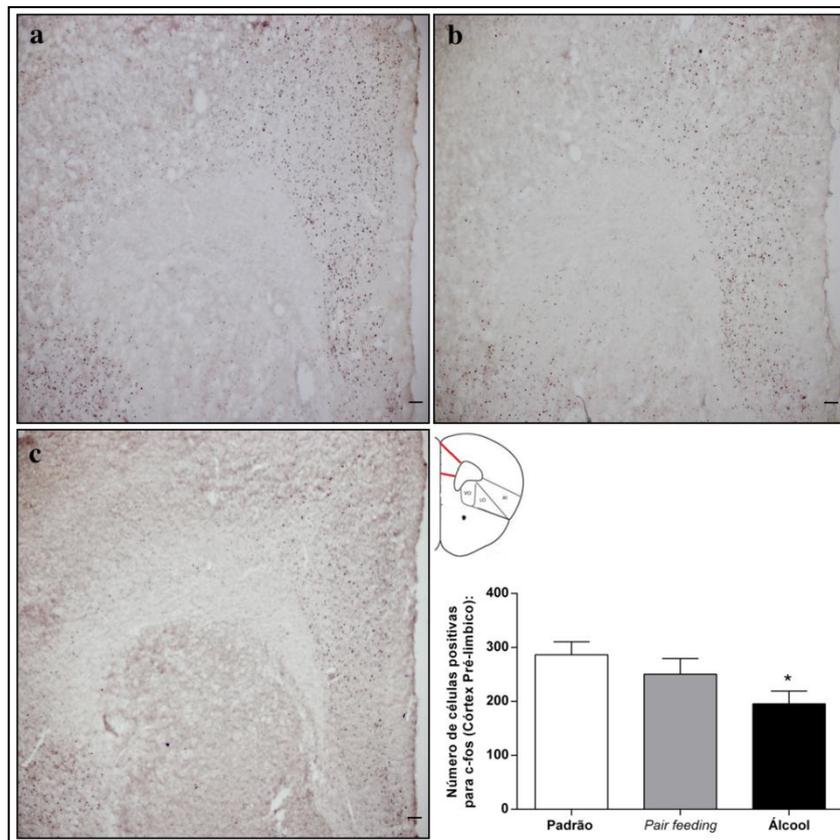
Figura 34 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no AcbSh.



Fonte: Da autora.

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM ($n= 04-07$ animais por grupo) e detalhados na tabela 17 do apêndice. As barras representam $100\mu\text{m}$, foto em aumento de $4\times$. Os símbolos representam o nível de significância: *** $p < 0,001$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; ### $p < 0,001$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

Figura 35 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no PrL.



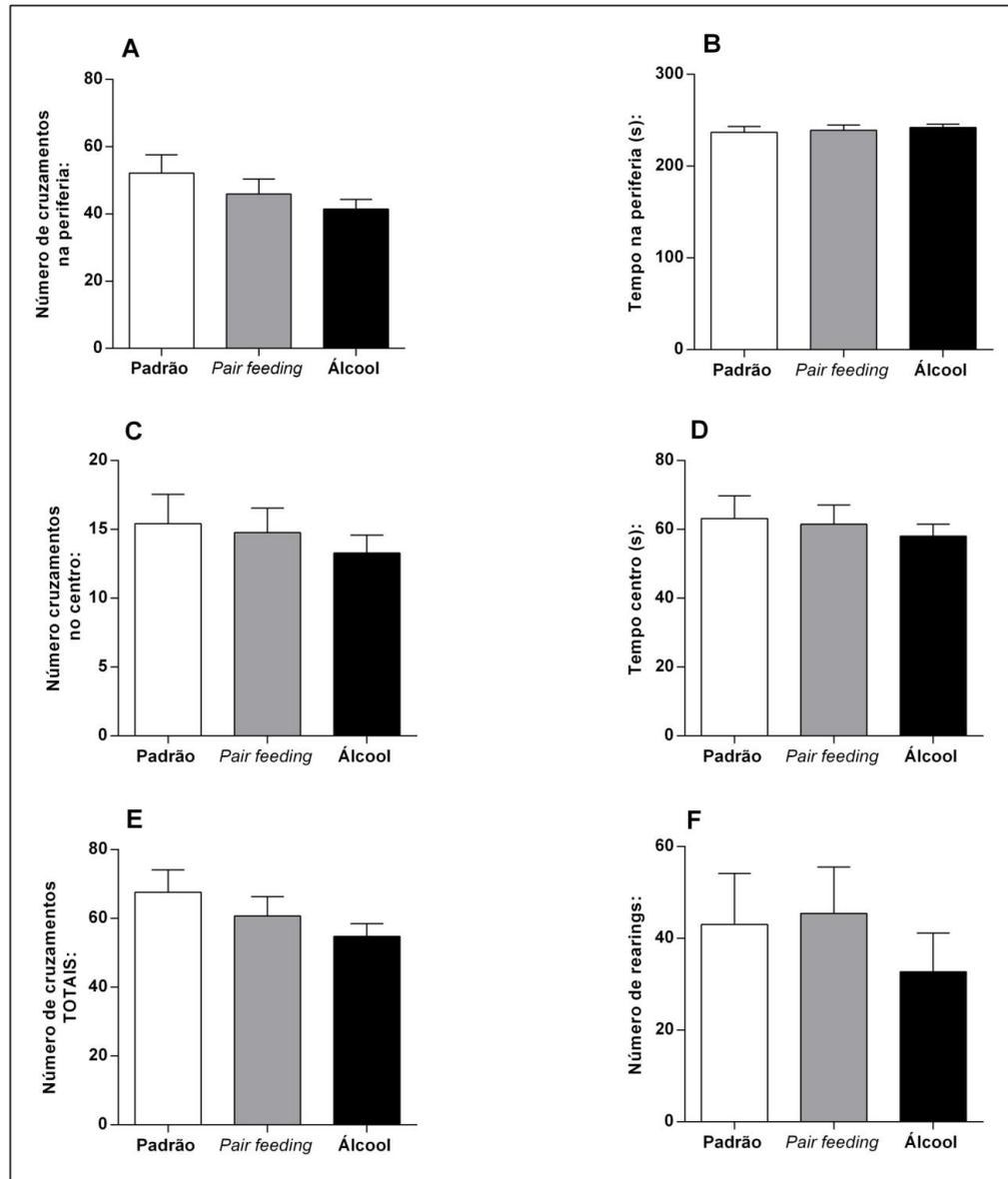
Fonte: Da autora

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 04-07 animais por grupo) e detalhados na tabela 17 do apêndice. As barras representam 100 μ m, foto com aumento de 4x. Os símbolos representam o nível de significância: * $p < 0,05$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão.

7.2.5.4 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no campo aberto durante a vida adulta

Conforme descrito pela Tabela 18 (APÊNDICE) e demonstrado graficamente pela Figura 36, animais expostos durante a idade adulta ao teste de campo aberto não apresentaram alterações no número de cruzamentos na periferia ($p = 0,22$), tempo na periferia ($p = 0,79$), número de cruzamentos centrais ($p = 0,67$), tempo no centro ($p = 0,78$), número de cruzamentos totais ($p = 0,25$) e número de *rearings* ($p = 0,37$) quando comparados os grupos álcool, *pair feeding* e padrão.

Figura 36 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de *camundongos* durante a vida adulta no Teste de campo aberto.



Fonte: Da autora.

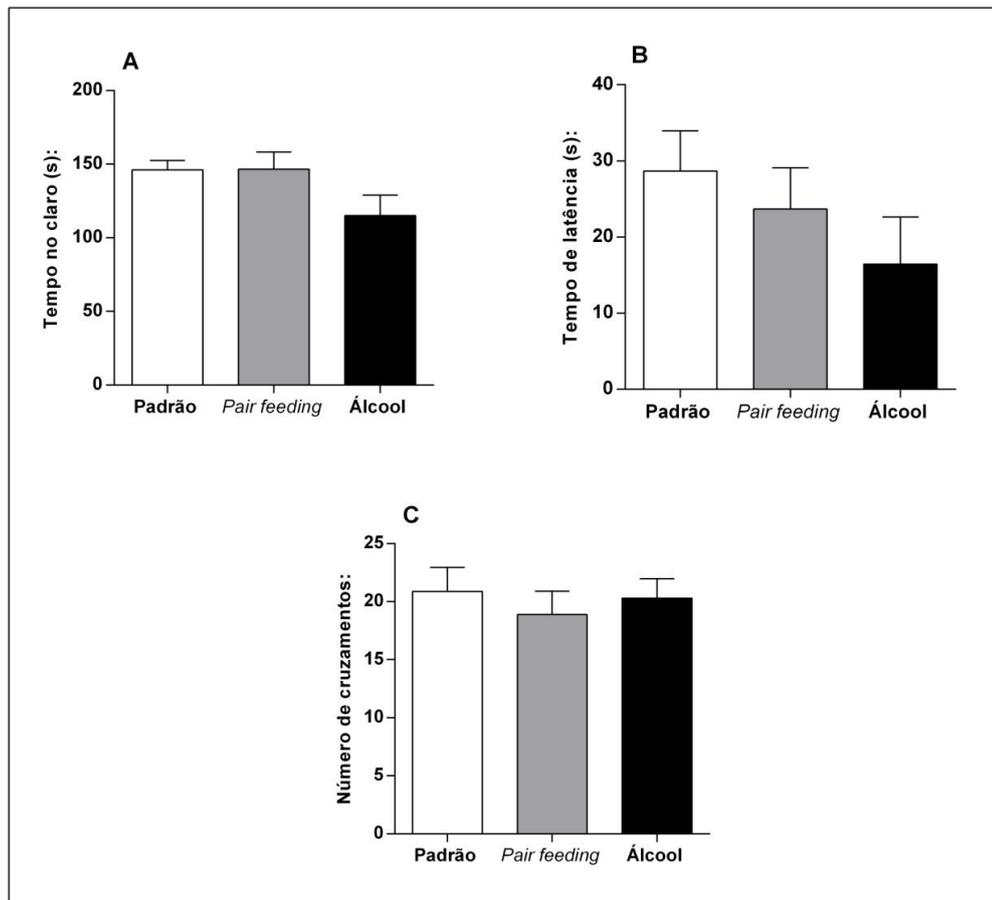
Nota: (A) Número de cruzamentos na periferia, (B) Tempo na periferia, (C) Número de cruzamentos no centro, (D) Tempo no centro, (E) Número de cruzamentos totais, (F) Número de *rearings*. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 18 do apêndice.

7.2.5.5 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de *camundongos* no claro-escuro durante a vida adulta

Conforme observado através da ilustração gráfica 37 e da Tabela 19 (APÊNDICE), nos resultados do teste de claro-escuro, não foram encontradas diferenças estatísticas entre

animais do grupo álcool, *pair feeding* e padrão, em nenhum dos parâmetros analisados: tempo no claro ($p = 0,09$), tempo de latência ($p = 0,32$) e número de cruzamentos ($p = 0,75$).

Figura 37 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina *de camundongos* durante a vida adulta no Teste de claro-escuro.



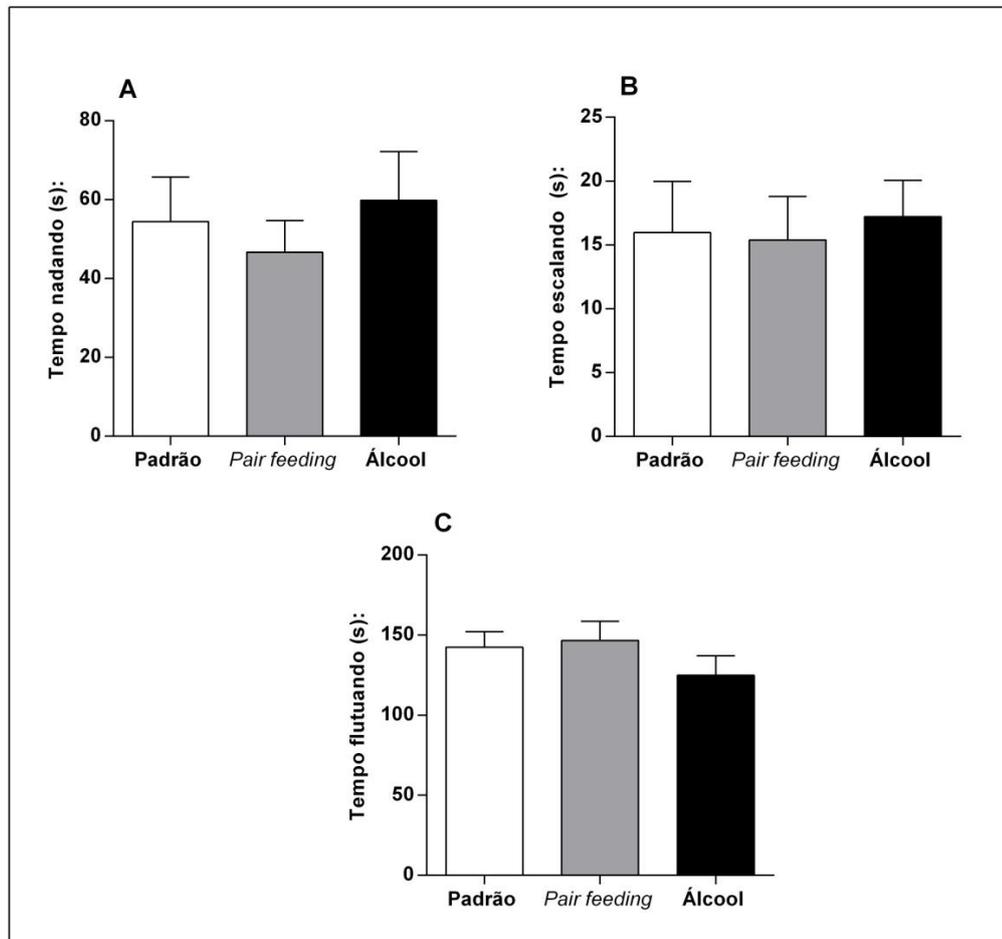
Fonte: Da autora

Nota: (A) Tempo no claro, (B) Tempo de latência, (C) Número de cruzamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 19 do apêndice.

7.2.5.6 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina *de camundongos* no Teste de nado forçado durante a vida adulta

Como demonstrado pelos valores na Tabela 20 (APÊNDICE) e ilustrado pela Figura 38, a análise estatística ANOVA *one way*, seguida de pós-teste *Newman-Keuls*, não encontrou diferenças estatisticamente significantes no tempo nadando ($p = 0,7$), tempo escalando ($p = 0,93$) e tempo flutuando ($p = 0,36$) dos animais nos grupos álcool, *pair feeding* e padrão.

Figura 38 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de *camundongos* durante a vida adulta no Teste de nado forçado.



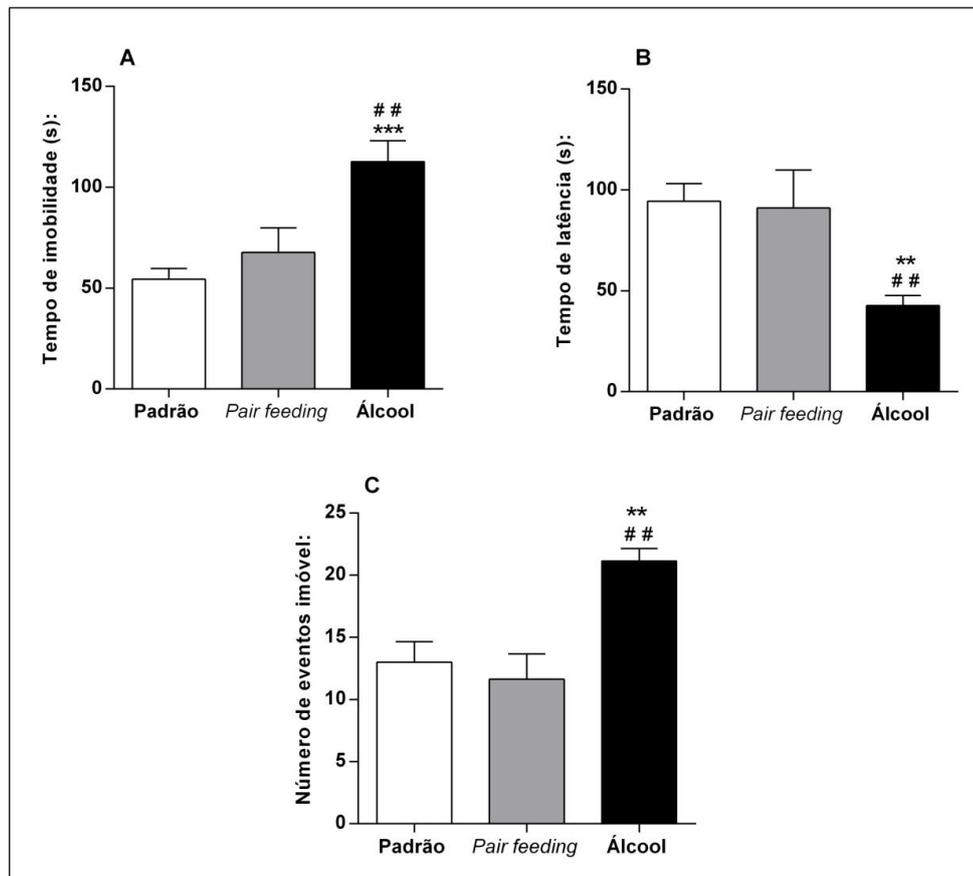
Fonte: Da autora.

Nota: (A) Tempo escalando, (B) tempo nadando, (C) tempo flutuando. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 20 do apêndice.

7.2.5.7 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de *camundongos* no Teste de suspensão pela cauda durante a vida adulta

Como apresentado pela Tabela 21 (APÊNDICE) e ilustrado graficamente pela Figura 39, a avaliação através de ANOVA *one way* demonstrou aumento do tempo de imobilidade dos animais do grupo álcool ($p = 0,0003$), redução do tempo de latência para o primeiro evento de imobilidade apresentado pelos animais do grupo álcool ($p = 0,005$) e aumento do número de eventos imóveis apresentados pelos animais do grupo álcool ($p = 0,001$) quando comparados ao grupo *pair feeding* e padrão.

Figura 39 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de *camundongos* durante a vida adulta no Teste de suspensão pela cauda.



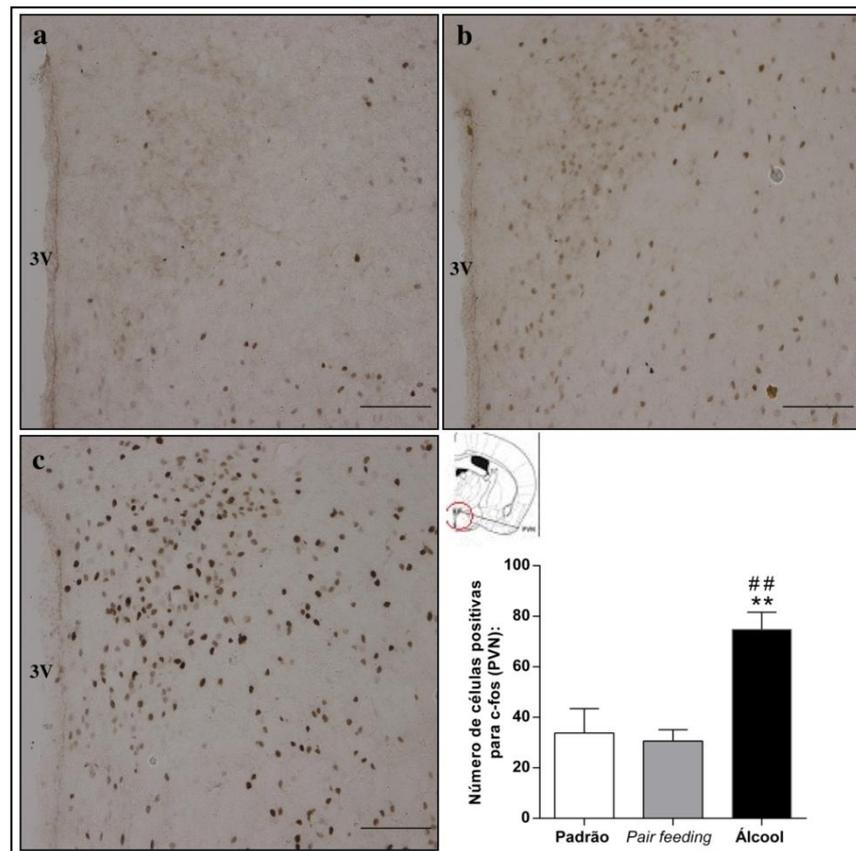
Fonte: Da autora.

Nota: (A) Tempo de imobilidade, (B) Tempo de latência. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 21 do apêndice. Os símbolos representam o nível de significância: ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo padrão e ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo *pair feeding*.

7.2.5.8 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do teste de suspensão pela cauda na expressão de células positivas para *c-fos* no encéfalo de *camundongos*

Como descrito pela Tabela 22 (APÊNDICE) e ilustrado pelas fotomicrografias e gráficos, a avaliação através da análise estatística ANOVA *one way* demonstrou aumento do número de células positivas para *c-fos* no PVN ($p = 0,001$, Fig. 40) e LC ($p = 0,001$, Fig. 41) quando comparados filhos de mães expostas ao álcool durante a gestação a animais do grupo padrão e *pair feeding*. Nenhuma alteração foi evidenciada no NS ($p = 0,11$, Tabela 22), BNST ($p = 0,52$, Tabela 22), NAshell ($p = 0,53$, Tabela 22), AI ($p = 0,52$, Tabela 22), e Ac ($p = 0,91$, Tabela 22), quando comparados animais do grupo álcool e seus controles (padrão e *pair feeding*).

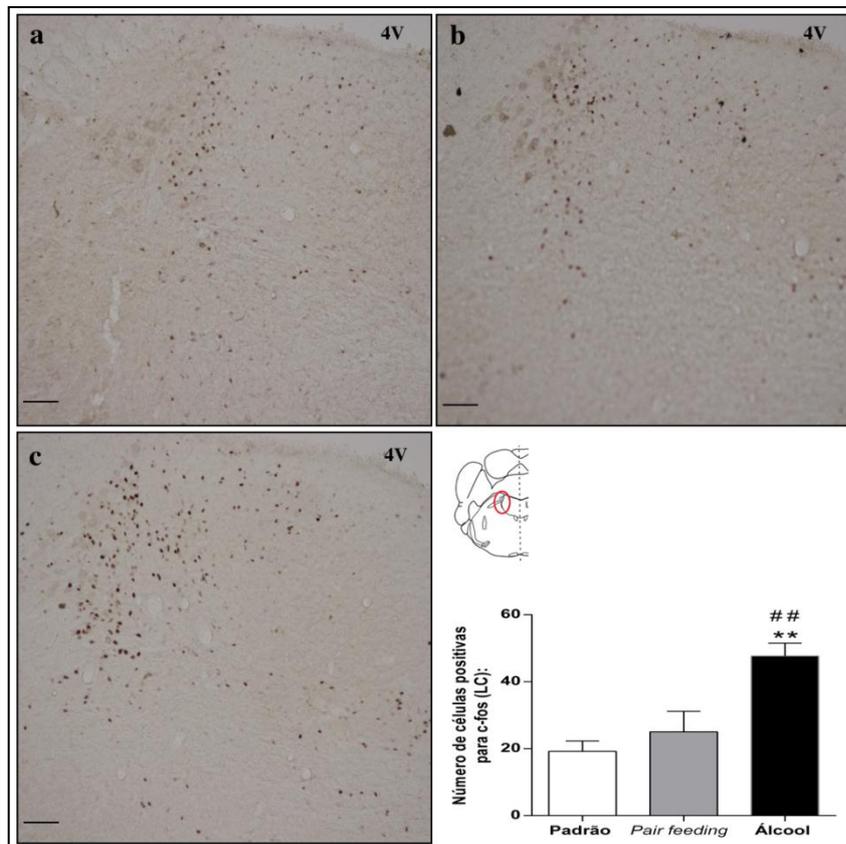
Figura 40 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do testes de SPC na expressão de células positivas para c-fos no PVN.



Fonte: Da autora.

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 05-06 animais por grupo) e detalhados na tabela 22 do apêndice. As barras representam 100 μ m, foto com aumento de 20x. Os símbolos representam o nível de significância: ** $p < 0,01$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; ## $p < 0,01$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

Figura 41 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do testes de SPC na expressão de células positivas para c-fos no LC.



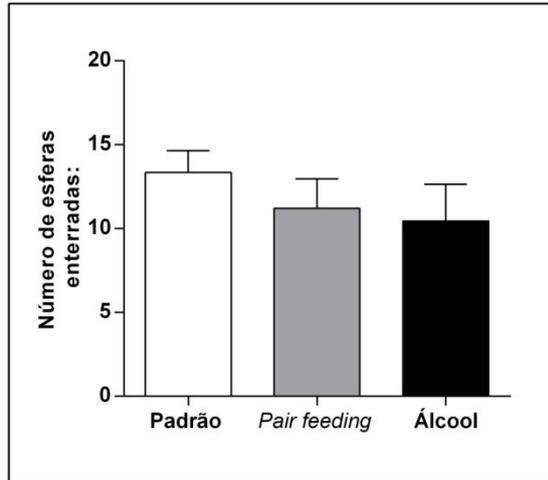
Fonte: Da autora.

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo da prole. (a) grupo padrão, (b) grupo *pair feeding* e (c) grupo álcool. Dados apresentados como média \pm EPM (n= 05-06 animais por grupo) e detalhados na tabela 22 do apêndice. As barras representam 100 μ m, foto com aumento de 10x. Os símbolos representam o nível de significância: ** $p < 0,01$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; ## $p < 0,01$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

7.2.5.9 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de camundongos no Teste de enterrar esferas durante a vida adulta

A Figura 42 e a Tabela 23 (APÊNDICE) apresentam os resultados obtidos no teste de enterrar esferas. Como pode ser observado, não foram encontradas diferenças estatísticas no número de esferas escondidas pelos animais dos diferentes grupos experimentais ($p = 0,45$).

Figura 42 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de **camundongos** durante a vida adulta no Teste de enterrar esferas.



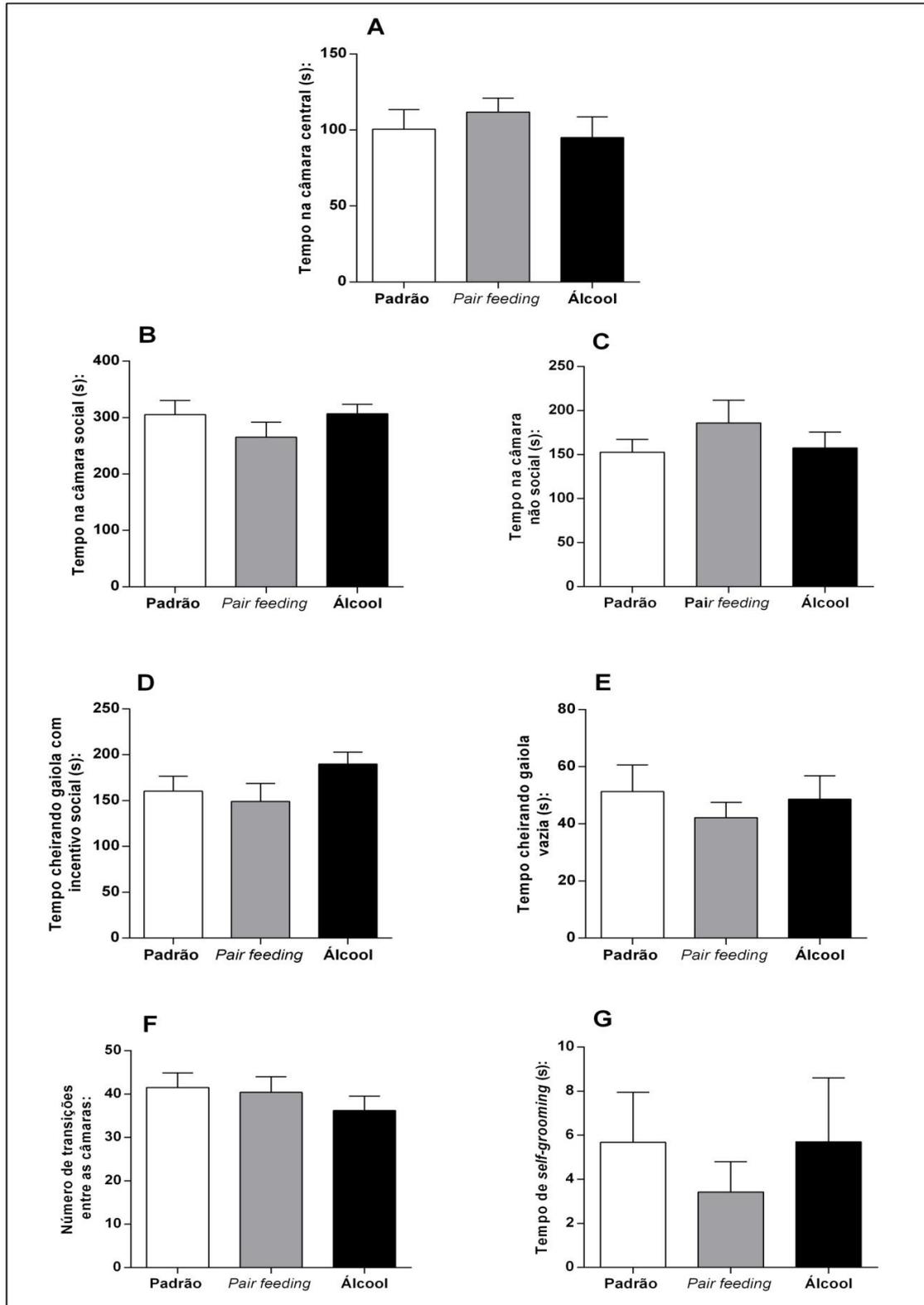
Fonte: Da autora.

Nota: Dados submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM e detalhados na tabela 23 do apêndice.

7.2.5.10 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de **camundongos** no Aparato de três câmaras durante a vida adulta

Conforme apresentado pela Tabela 24 (APÊNDICE) e ilustrado graficamente pela Figura 43, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes pela análise estatística ANOVA *one way*, seguido de pós-teste *Newman Keuls*, durante exposição ao aparato de três câmaras nos parâmetros: tempo na câmara central ($p = 0,61$), tempo na câmara social ($p = 0,38$), tempo na câmara não social ($p = 0,45$), tempo cheirando gaiola com incentivo social ($p = 0,21$), tempo cheirando gaiola vazia ($p = 0,69$), número de transição entre as câmaras ($p = 0,52$) tempo de *self-grooming* ($p = 0,71$).

Figura 43 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de **camundongos** durante a vida adulta no Aparato de três câmaras.



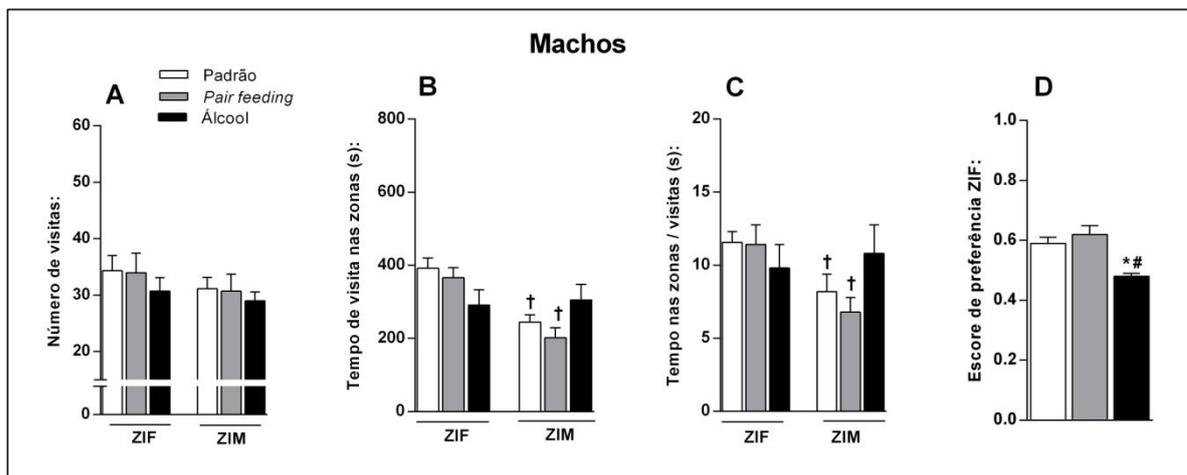
Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 24 do apêndice.

7.2.5.11 Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina e feminina de *ratas* no Teste de motivação sexual durante a vida adulta

Como apresentado pela Tabela 25 (APÊNDICE) e ilustrado graficamente pela Figura 44, embora não tenha ocorrido alteração no número de visitas na ZIM e ZIF (Fig. 44 A), machos do grupo padrão e *pair feeding* passaram mais tempo na ZIF do que na ZIM (Fig. 44 B). Esses animais também visitaram a ZIF mais frequentemente do que o ZIM (Fig. 44 C). Além disso, a prole masculina do grupo álcool apresentou redução no escore de preferência para a ZIF quando comparados ao grupo padrão e *pair feeding* ($p < 0,05$, Fig. 44 D).

Figura 44 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de *ratas* no Teste de motivação sexual durante a vida adulta.



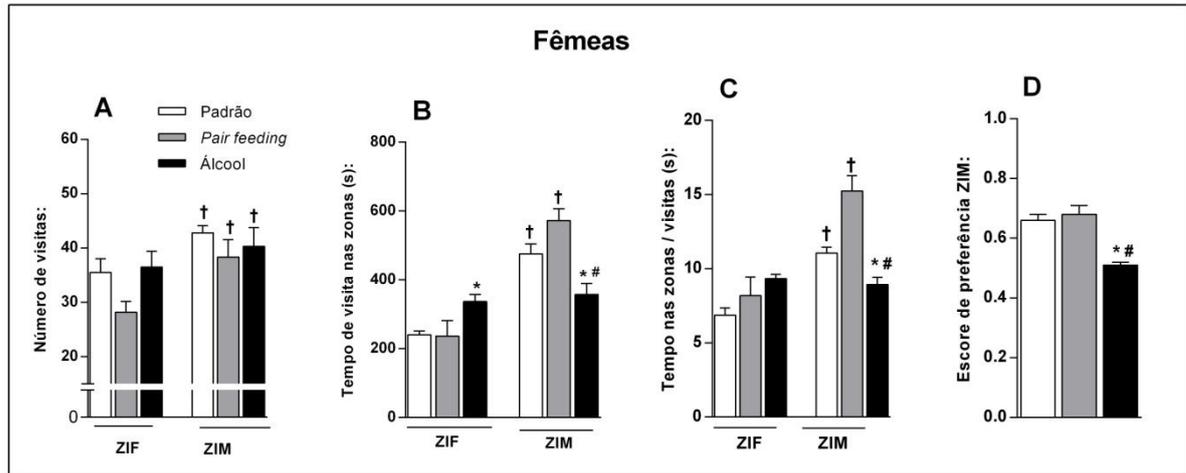
Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 25 do apêndice. Os símbolos representam o nível de significância: $+p < 0,05$ quando comparado animais do mesmo grupo experimental visitando a ZIF; $*p < 0,05$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo padrão; $\#p < 0,05$ quando comparado animais do grupo álcool ao grupo *pair feeding*.

Conforme ilustrado pela Figura 45 e descrito na Tabela 26 (APÊNDICE), embora fêmeas de todos os grupos experimentais tenham apresentado maior número de visitas a ZIM ($p < 0,05$; Fig. 45 A), apenas fêmeas do grupo *pair feeding* e padrão passaram mais tempo na ZIM ($p < 0,05$; Fig. 45 B). Já a prole feminina do grupo álcool passou menos tempo na ZIM ($p < 0,05$; Fig. 45 B) e permaneceu mais tempo na ZIF ($p < 0,05$, Fig. 45 B). A frequência de visita dos animais do grupo padrão e *pair feeding* apresentou-se aumentada para a ZIM e animais do grupo álcool apresentaram a frequência reduzida quando comparados ao grupo *pair feeding* e padrão. O escore de preferência para o ZIM dos

animais álcool também se apresentou reduzido quando comparado aos grupos padrão e *pair feeding* ($p < 0,05$; Fig. 45 D).

Figura 45- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole feminina no Teste de motivação sexual durante a vida adulta



Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média \pm EPM e detalhados na tabela 26 do apêndice.

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento pré-natal crônico (G6-G19) com álcool refletiu baixa concentração de etanol no sangue dos animais prenhes, sendo este padrão de exposição capaz de acarretar prejuízos à prole. Tais prejuízos foram evidenciados pelo alto índice de óbito pós-natal, baixo peso ao nascer, redução do peso e da distância nasoanal até o início da vida adulta, atrasos em parâmetros do desenvolvimento físico (abertura dos olhos) e reflexo (geotaxia negativa e endireitar), além de redução do comportamento social da brincadeira durante a adolescência e aumento das respostas preditivas de depressão no teste de SPC na fase adulta, juntamente com alterações na ativação neuronal de áreas centrais envolvidas nestes comportamentos. Também durante a vida adulta, foram evidenciados prejuízos na preferência sexual da prole masculina e feminina de ratas, quando avaliados no teste de motivação sexual.

Tais efeitos confirmam as propriedades teratogênicas do álcool e os riscos do consumo durante a gestação. Em pesquisas envolvendo animais, o modelo de exposição alcoólica através de dieta líquida é amplamente empregado e aceito (BARNES ; WALKER, 1981; McMURRAY et al., 2008; TUNC-OZCAN; FERREIRA; REDEI, 2016). No presente estudo, a adoção deste modelo de autoadministração crônica permitiu o controle de variáveis relacionadas ao estresse da administração forçada (através de gavagem, intubação intragástrica, injeção endovenosa ou intraperitoneal) e possibilitou que os animais consumissem livremente o álcool ao longo dos dias, demonstrando-se como uma metodologia eficaz para reprodução e estudo de DEAF.

A primeira questão levantada no estudo foi acerca dos efeitos da exposição à dieta líquida acrescida de álcool durante a gestação sobre ratas e camundongos fêmeas prenhes. Respondendo este questionamento, a avaliação da ingestão evidenciou redução do consumo de dieta pelo grupo álcool quando comparado a animais com livre acesso a dieta líquida sem álcool. Tal alteração pode ser justificada pelos efeitos do álcool sobre a redução do apetite (ASTOVIZA; SUÁREZ, 2003). Segundo pesquisas a causa da inapetência (perda do apetite) observada pelo consumo de álcool é decorrente de variados fatores, como o consumo de calorias que não apresentam nenhum valor nutricional (7,2 Kcal) e podem reduzir o consumo total de alimentos, alterações no metabolismo, irritação da mucosa gástrica e aumento dos níveis de leptina (ASTOVIZA; SUÁREZ, 2003; MAIO; DICHI; BURINI, 2000; NICOLÁS et al., 2001). Além desses fatores, sabe-se que o álcool não apresenta sabor palatável para roedores, tornando comum a aversão e menor ingestão pelos animais (LIEBER; DECARLI,

1982, 1989). Esta redução da ingestão total de alimentos reafirma a importância da realização de um controle nutricional que receba a mesma quantidade de dieta ingerida pelos animais do grupo álcool, o chamado *pair feeding*. Sob estas condições, este grupo experimental não desenvolve alterações teratogênicas do álcool, sendo os efeitos obtidos secundários e atribuídos à ingestão insuficiente de nutrientes, o que o torna, um importante controle da variável nutricional.

A avaliação do peso dos animais apontou que ratas prenhes do grupo álcool (e conseqüentemente o grupo *pair feeding*) apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos animais dieta livre, sendo tal redução provavelmente relacionada ao consumo das calorias alcoólicas, isto porque, cada grama de álcool apresenta 7,2 Kcal, que não possui nenhum valor nutricional e propicia a redução do consumo geral de alimentos o que pode repercutir no ganho final de peso dos animais (ABEL; DINTCHEFF, 1978; NESS FRANCHINA, 1990). Tal alteração no ganho de peso não foi observada nos camundongos fêmeas prenhes, sendo esta divergência dos resultados entre os roedores comum na literatura com pesquisas que corroboram ou não as evidências aqui reportadas (BLANCHARD; HANNIGAN, 1994; CULLEN et al., 2013; HANNIGAN et al., 1988; MIDDGAUGH; BOGGAN, 1995). Uma possível justificativa para tal divergência pode ser as diferenças existentes no metabolismo dos animais. Sabe-se que o metabolismo de pequenos roedores é relacionado à aproximadamente $2/3$ da potência do peso corporal total (o chamado peso metabólico), que é usado para justificar comparações entre animais de pesos e tamanhos diferentes e mesmo entre espécies diferentes (FAGUNDES; TAHA, 2004).

A análise das amostras de sangue possibilitou a detecção de etanol em todos os animais prenhes submetidos ao tratamento com dieta líquida acrescida de álcool. A variabilidade dos valores obtidos pode ser relacionada à ingestão no momento antes da coleta. Unindo-se a esta justificativa, pesquisas também afirmam que diversos fatores podem afetar os níveis de álcool no sangue de roedores, dentre estes fatores estão a linhagem, espécie, idade e estado alimentado do animal, sugerindo estas variáveis como responsáveis pelas diferentes concentrações de álcool no sangue de ratos e camundongos (COLLINS et al., 1975; DESROCHES; OREVILLO; VERINA, 1995; KELLY; BONTIUS; WEST, 1987; MAIER et al., 1995; MAIER; WEST, 2001).

É importante ressaltar que as conseqüências do consumo de álcool durante a gestação sobre a prole dependem, entre outros fatores, da quantidade e do padrão de consumo da bebida. Segundo Maier e West (2001), a dose administrada de álcool não pode ser considerada uma medida eficaz para extrapolar os resultados de estudos animais para seres

humanos, pois o metabolismo do álcool difere entre várias espécies, e deste modo, a mesma dose em termos de gramas de álcool pode ter consequências muito diferentes para o feto humano quando comparado ao animal. Neste contexto, o método mais eficaz para avaliar a quantidade de álcool dada a um sujeito e para comparar os efeitos de diferentes doses ou entre diferentes indivíduos é medir as concentrações de álcool no sangue, pois estas sugerem a quantidade aproximada de álcool que o feto ou embrião foram expostos (MAIER; WEST, 2001). Diante disto, respeitando a variabilidade das concentrações citadas pela literatura e associando estas à média dos valores apresentados, pode-se sugerir que as concentrações de etanol obtidas no presente estudo são classificadas como baixa (MARQUARDT; BRIGMAN, 2016; POPOOLA et al., 2015; PROBYN et al., 2013).

Além da concentração de álcool, outra importante variável que poderia influenciar os resultados obtidos no presente estudo é o cuidado oferecido pela mãe à prole durante a lactação. Isto ocorre porque após o nascimento, o filhote se mostra totalmente dependente e vulnerável, de modo que sua sobrevivência, desenvolvimento e comportamento até a fase adulta, podem ser diretamente influenciados pela relação mãe-filhote. Unindo-se a este conhecimento, no presente estudo a avaliação do comportamento materno se torna ainda mais relevante, pois genitoras que consomem álcool podem ter tal comportamento alterado não apenas pelas influências diretas do álcool sobre a mãe, mas também pelos prejuízos acarretados pelo álcool sobre a prole. Isto porque, tais prejuízos são caracterizados por mudanças nas respostas dos filhotes durante a amamentação (gastam mais tempo para anexar ao mamilo e menor tempo anexado) e vocalização, sendo estes comportamentos capazes de influenciar respostas relacionadas ao cuidado materno (CHEN; DRISCOLL; RILEY, 1982; KEHOE; SHOEMAKER, 1991).

Embora prejuízos no cuidado materno sejam apresentados em trabalhos clínicos e experimentais (MARINO et al., 2002; NESS; FRANCHINA, 1990; SAVONLAHTI et al., 2004; WORKMAN et al., 2015) no presente estudo, não foram encontradas alterações neste comportamento. Tais divergências entre os resultados podem provavelmente ser associadas aos diferentes níveis de exposição ao álcool, pois estudo de Popoola et al., (2015) que obteve baixas concentrações de álcool no sangue dos animais (50 mg/dL) também não evidenciou alterações no comportamento materno destes. É importante destacar a relevância do resultado aqui reportado, pois este permite propor que os prejuízos apresentados pela prole não sofreu a interferência do cuidado materno, refletindo diretamente efeitos do álcool.

Após a avaliação das mães, eliminação de variáveis relacionadas ao cuidado materno, e definição dos níveis de álcool no sangue dos animais, o próximo questionamento a ser respondido pelo estudo foi acerca dos efeitos que a concentração de álcool utilizada poderia acarretar sobre a prole.

Respondendo a esta questão, a avaliação do número de filhotes nascidos por mãe, não apontou alterações nos animais tratados com álcool quando comparados aos grupos experimentais controle. A ausência de tal prejuízo pode ser associada ao período gestacional em que o tratamento foi iniciado, pois no presente estudo os animais prenhes foram tratados após o período de implantação ou pré-embriônico e estudos apontam que esta fase da gestação é mais vulnerável aos efeitos do álcool, o que poderia propiciar a redução do número de implantações, aumento da reabsorção embrionária, anormalidades cromossômicas e até morte fetal (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996; HENRIKSEN et al., 2004; MITCHELL, 1994). Além disso, unindo-se ao período de exposição ao álcool, pesquisas sugerem que apenas altas concentrações de álcool seriam consideradas abortivas (ABEL, 1997).

Embora não ocorram alterações no número de filhotes nascidos por mãe, a prole do grupo álcool apresentou alto índice de óbito no DPN2. É importante ressaltar que a morte dos filhotes não foi relacionada ao canibalismo materno, pois os mesmos encontravam-se intactos na caixa moradia, sendo este achado corroborado por pesquisas que associam o canibalismo a altas concentrações de álcool (ABEL, 1979).

Ainda procurando justificar o alto índice de óbito pós-natal, Middaugh e Boggan, (1995), associaram tal resultado com a retirada do álcool 24 horas antes do parto. Isto porque, evidências do estudo demonstraram a redução da mortalidade quando a dieta era continuada e administrada durante a lactação, sugerindo que pequenas quantidades de álcool transmitidas ao neonato através da lactação "seriam suficientes" para reduzir a gravidade da retirada e preveniria à morte (MIDDAUGH; BOGGAN, 1995). No presente estudo, o álcool também foi retirado 24 horas antes do parto, fato que pode ter propiciado o alto índice de óbito neonatal. Além dessa hipótese, sugere-se que a morte neonatal pode ser associada ao baixo peso ao nascer, pois animais descendentes de mães tratadas com álcool nasciam muito debilitados, o que poderia dificultar a amamentação (CHEN; DRISCOLL; RILEY, 1982) e a sobrevivência nas primeiras horas pós-nascimento.

Com relação à redução do peso ao nascer em camundongos, ao menos em parte, este resultado foi decorrente da deficiência nutricional, como sugerido pela avaliação do grupo *pair feeding*. Apesar deste efeito, a influência do álcool não pode ser descartada, visto que os

resultados também foram diferentes quando comparados ao *pair feeding*. Embora estudos apontem a ausência de alterações no peso ao nascer de animais submetidos a baixas concentrações de álcool, na literatura clínica e experimental, os efeitos ainda não estão claros (ABEL, 1996; MARISCAL et al., 2006). Além disso, pesquisadores já demonstraram que o consumo diário de bebidas alcoólicas seria mais associado a consequências sobre o crescimento fetal, do que o consumo esporádico (MARISCAL et al., 2006), o que pode justificar os resultados obtidos no presente estudo, pois este evidencia que a exposição intrauterina crônica ao álcool, mesmo que em baixas concentrações, foi capaz de retardar o crescimento dos filhotes.

Além de alterações no peso ao nascer, os animais expostos ao álcool durante o período pré-natal apresentaram redução do peso e da distância nasoanal (comprimento corporal) na adolescência e vida adulta, sendo este resultado consistente com outros estudos (ABEL, 1996; CARTER et al., 2013; GEVA et al., 1993; MARISCAL et al., 2006; MIDDAGH; BOGGAN, 1995; PROBYN et al., 2012; SHRESTHA; SINGH, 2013). Os mecanismos envolvidos nestes déficits ainda são obscuros, mas estudo utilizando a metodologia de *cross-fostering* já demonstrou que a redução do crescimento não é mediada por interferências maternas no pós-nascimento (MIDDAGH; BOGGAN, 1991). Também, Middaugh e Boggan, (1995) já descartaram a hipótese de que o crescimento atenuado durante adolescência e vida adulta possa ser associado com a redução na ingestão calórica no pós-desmame (MIDDAGH; BOGGAN, 1995). Até o momento, as evidências que melhor explicam estas alterações sugerem que a exposição ao etanol durante a gravidez pode afetar os níveis do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e II), sendo este fator importante para o crescimento pré e pós-natal, o que justificaria tais alterações (AROS et al., 2010; BREESE et al., 1993).

Durante a avaliação do desenvolvimento físico apenas filhotes fêmeas apresentaram atrasos quando comparados ao grupo padrão e *pair feeding*, no parâmetro de abertura dos olhos. Os resultados aqui apresentados estão em concordância com pesquisas que também encontraram atrasos na abertura dos olhos, reafirmando assim, os prejuízos acarretados pelo álcool sobre o desenvolvimento da prole (ENDRES et al., 2005; GOTTFELD; SILVERMAN, 1990; THOMAS; ABOU; DOMINGUEZ, 2009). A ausência de alterações relacionadas à maturação física da prole masculina pode ser justificada por pesquisas em humanos que apontam que recém-nascidos do sexo feminino apresentam maior sensibilidade aos efeitos desta droga (FREIRE et al., 2005).

Após o nascimento, a observação diária dos reflexos no neonato pode se tornar um indicador sensível para análise dos primeiros estágios do desenvolvimento. Embora no período pós-natal parte do sistema sensorial esteja completa ela ainda não está totalmente funcional e deste modo, após o nascimento, os filhotes desenvolvem respostas aos estímulos e aumentam o nível de sensibilidade pouco a pouco, aprimorando sua capacidade de discriminação e cognição. Dentre as alterações do desenvolvimento reflexo associadas à teratogenicidade do álcool no presente estudo, foram encontrados atrasos no teste de geotaxia negativa na prole feminina e no reflexo de endireitar em machos.

De acordo com Motz e Alberts (2005), a geotaxia negativa remete a função vestibular e a propriocepção, sendo uma resposta de orientação com movimentos expressos a pistas de vetores gravitacionais e um dos mais importantes reflexos para avaliação da função sensorial. Já o reflexo de endireitar ou medular postural, é um reflexo relativamente complexo, relacionado à postura, parcialmente integrado na medula. Este reflexo é uma medida de coordenação neuromuscular, e ocorre quando o animal retorna imediatamente a sua posição normal sobre as quatro patas em decúbito ventral (TUPPER; WALLACE, 1980). O retardo na apresentação destes reflexos reafirma a influência do consumo pré-natal de álcool sobre a prole e corrobora estudos que apontam que filhos de mães alcoolistas, apresentam um desempenho totalmente pobre diante da necessidade da utilização do sistema sensorial, bem como em tarefas que exijam controle motor e força muscular (ENDRES et al., 2005; GOTTESFELD; SILVERMAN, 1990; THOMAS; ABOU; DOMINGUEZ, 2009). Outras alterações apresentadas por machos e fêmeas, no desenvolvimento físico e reflexo no presente estudo, não podem ser associadas à teratogenicidade do álcool, pois o grupo *pair feeding* também apresentou alterações, sugerindo assim, um efeito secundário relacionado à variável nutricional.

É importante ressaltar que as alterações físicas obtidas no presente estudo caracterizam aspectos das DEAF e confirmam que mesmo a exposição à baixa concentração de álcool é capaz de acarretar prejuízos no desenvolvimento da prole. Diante destas evidências, e sendo os transtornos decorrentes do consumo de álcool durante a gestação, também manifestados por déficits comportamentais, a terceira e quarta questões levantadas no estudo foi acerca de quais as influências que esta concentração de álcool poderia acarretar sobre o comportamento da prole.

A idade estabelecida para o início do estudo comportamental foi a adolescência, pois esta fase é caracterizada como um período biopsicossocial crítico, descrito por mudanças no

corpo, na cognição, emoção, comportamento e aspectos sociais (SCHERFA; BEHRMANN; DAHL, 2012), o que a torna uma fase de escolha para a realização de estudos, diante de sua importância para o desenvolvimento comportamental e a emergência de certos distúrbios psiquiátricos (SPEAR, 2000).

Esta fase envolve etapa crítica para o estabelecimento de vínculos sociais, assim como também, para o desenvolvimento da relação do sujeito com o ambiente. Estes eventos ocorrem na transição da infância para a vida adulta, o que impõem ao indivíduo desafios que permitem a aquisição das habilidades necessárias para a sobrevivência longe do cuidado parental (SPEAR, 2000). Entre o desmame e a puberdade, os jovens de todas as espécies de mamíferos (incluindo humanos) exibem uma característica forma de interação social, denominada como comportamento social da brincadeira, sendo esta a primeira interação social da prole não dirigida à mãe.

A brincadeira é um comportamento afiliativo, que facilita o desenvolvimento social, influenciando diferentes aspectos, de modo a contribuir para o funcionamento da aquisição social adequada (VANDERSCHUREN; NIESINKT; REE, 1997). Neste contexto, estudos sugerem que a redução do comportamento de brincar pode acarretar consequências na vida adulta, demonstrando-se capaz de influenciar a formação cognitiva e emocional dos indivíduos (HOMBERG et al., 2007; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2014).

Com o intuito de aumentar a expressão de respostas comportamentais relacionadas à brincadeira, os animais foram expostos a duas condições de alojamento: isolado ou agrupado. Esta metodologia foi adotada diante de estudos que apontam que o isolamento por sete dias durante a adolescência acarreta a privação da brincadeira (*play deprivation*), o que propicia a posterior elevação de comportamentos relacionados à interação social durante a adolescência (TERRANOVA; LAVIOLA; ALLEVA, 1993; VANDERSCHUREN; NIESINKT; REE, 1997). Deste modo, após a realização do confronto entre um animal previamente isolado e um animal agrupado, observa-se que o animal isolado inicia mais vigorosamente a brincadeira, manifestando aumento dos parâmetros relacionados ao comportamento de brincar (TERRANOVA; LAVIOLA; ALLEVA, 1993; VIEIRA; OTTA, 1997).

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que após o isolamento, animais do grupo padrão e *pair feeding* aumentaram respostas relacionadas à brincadeira, sendo esta intensificação do comportamento pelo isolamento, amplamente estabelecido em inúmeros trabalhos (PANKSEPP; BEATTY, 1980; TERRANOVA; LAVIOLA; ALLEVA, 1993; VANDERSCHUREN; NIESINKT; REE, 1997; VARLINSKAYA; SPEAR; SPEAR, 1999).

Embora o aumento da brincadeira seja um resultado esperado em animais isolados, este não ocorreu no grupo álcool. Corroborando estes resultados, estudos apontam as consequências que o consumo pré-natal de álcool pode acarretar sobre o comportamento social durante a adolescência da prole (LAWRENCE et al., 2007; MEYER; RILEY, 1986; MOONEY; VARLINSKAYA, 2011). Contudo, todos os estudos encontrados até o momento, obtiveram altas concentrações de álcool no sangue dos animais prenhes, sendo o presente estudo, o primeiro a demonstrar tais alterações diante do baixo nível de exposição pré-natal.

Lugo et al. (2003), sugere que curtos períodos de isolamento social propiciam mudanças na motivação social, por meio da alteração de mecanismos neurais, tornando classicamente a privação social como um modelo que aumenta a motivação. Corroborando essa informação, pesquisas apontam que o isolamento social acarreta aumento da motivação para a interação social positiva, sugerindo que alterações centrais poderiam regular e modificar o desejo dos animais em buscar e expressar a socialização (IKEMOTO; PANKSEPP, 1992).

Claramente, a expressão de um comportamento complexo como a brincadeira social envolve uma ampla gama de circuitos neurais. Sabe-se que comportamentos sociais requerem um conjunto distribuído de circuitos, que, além do envolvimento de regiões como o córtex pré-frontal, também ativa regiões relacionadas ao prazer e a motivação como o núcleo accumbens e a amígdala, por se tratar de um comportamento altamente gratificante (VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN REE, 1997; van KERKHOF et al., 2013).

A avaliação da participação de regiões do córtex pré-frontal no comportamento social da brincadeira vem do conhecimento de que tal comportamento é mais evidente e complexo nos mamíferos, sendo nestas espécies, o córtex cerebral mais elaborado, sugerindo assim, um possível envolvimento de áreas corticais nestas respostas (VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN REE, 1997). Recentes pesquisas demonstram que a atividade neuronal é aumentada nas regiões corticais durante o comportamento social da brincadeira e que a inativação temporária de tais regiões (como o córtex pré-límbico) através da administração de agonistas do receptor GABA, é capaz de acarretar uma acentuada redução deste comportamento (van KERKHOF et al., 2013).

Unindo-se a este conhecimento, estudos também apontam que danos no córtex pré-frontal orbital em primatas, e correspondente córtex insular agranular em roedores, tem sido consistentemente associada a alterações no comportamento social da brincadeira (HAMILTON et al., 2010). No presente estudo, a compreensão dos substratos neurais envolvidos nas alterações comportamentais decorrentes da exposição pré-natal ao álcool,

apontou redução da ativação de regiões corticais como o córtex insular agranular, córtex pré-linguístico, córtex cingulado e córtex piriforme. Hamilton e colaboradores (2010) também demonstraram que a exposição pré-natal ao álcool é capaz de acarretar alterações na estrutura dendrítica e na plasticidade estrutural de neurônios do córtex insular agranular e do córtex pré-linguístico, apontando prejuízos estruturais e sugerindo reduções nas sinapses excitatórias.

O núcleo accumbens dividi-se em duas regiões específicas, sendo elas a porção core e a porção shell (SALGADO; KAPLITT, 2015). No presente estudo, a análise da porção shell foi definida diante de pesquisas que demonstram a participação desta porção na modulação do comportamento social da brincadeira (van Kerkhof et al., 2013), devido sua conhecida função motivacional (IKEMOTO; PANKSEPP, 1999; SALAMONE, 1994).

As evidências aqui reportadas demonstram a atenuação da ativação neuronal do núcleo accumbens shell e podem ser corroboradas por pesquisas que também já demonstraram a alteração da atividade do SNC durante o jogo social em animais expostos ao álcool na vida intrauterina (LAWRENCE et al., 2007). Neste trabalho, os resultados também apontaram redução da ativação neuronal mensurada através da imunorreatividade para c-Fos em áreas do SNC, dentre elas o núcleo accumbens, sugerindo que as alterações decorrentes da exposição pré-natal ao álcool sobre o núcleo accumbens poderiam afetar a motivação dos animais nas respostas apresentadas durante o comportamento social da brincadeira (LAWRENCE et al., 2007). Embora o estudo anterior tenha sido realizado com a obtenção de altas concentrações de álcool no sangue dos animais prenhes (380 mg / dL) trabalhos apontam que mesmo a exposição a menores concentrações de álcool acarretam redução robusta na ramificação dendrítica e no comprimento dos neurônios espinhosos do núcleo accumbens shell (RICE et al., 2012), corroborando informações acerca dos efeitos danosos que mesmo baixos níveis de exposição pré-natal ao álcool podem acarretar em áreas neurais.

Ainda durante a fase juvenil os animais foram expostos ao teste de placa com buracos ou *hole board*, não sendo encontradas alterações no número de mergulhos quando comparados os diferentes grupos experimentais. Além disso, a avaliação deste teste demonstrou que os animais em estudo não apresentam alterações na atividade locomotora, o que possibilita a sugestão de que a prole exposta na vida intrauterina à baixa concentração de álcool não acarreta prejuízos na locomoção, o que torna esta, uma importante informação para o comportamento social da brincadeira e evidencia que as respostas obtidas não foram prejudicadas por alterações locomotoras dos animais. Até o momento foi encontrado apenas um estudo que avaliou animais submetidos ao álcool quanto a suas respostas comportamentais durante a adolescência no teste de placa com buracos. Neste trabalho, após submissão dos

animais ao teste no DPN 18, foi observado menor número de mergulhos no grupo álcool, interpretando tal resultado como redução da busca por novidade e neofobia frente ao novo ambiente (VAGLENOVA et al., 2008). A contradição entre os resultados dos estudos pode ser justificada pela dose de álcool utilizada e pela metodologia de administração adotada (gavagem), pois estas permitiram a detecção de altas concentrações de etanol no sangue dos animais (184 mg/dl), o que provavelmente propiciou a ocorrência de maiores efeitos teratogênicos da droga (VAGLENOVA et al., 2008).

Além de prejuízos durante a adolescência, estudos apontam que do mesmo modo, quando adultos, descendentes com DEAF apresentam alterações comportamentais, como déficits de memória, respostas tipo ansiosas, depressivas e prejuízos sociais (CULLEN et al., 2013; SHRESTHA; SINGH, 2013; VAGLENOVA et al., 2008). Diante deste conhecimento, a quarta questão levantada no presente estudo foi acerca das possíveis alterações que a exposição intrauterina a baixa concentração de álcool poderia acarretar sobre o desempenho comportamental da prole durante a vida adulta. Os testes utilizados para esta avaliação foram: testes preditivos de ansiedade, depressão, compulsividade, preferência social e preferência sexual na fase adulta.

Para avaliação das respostas preditivas de ansiedade os animais foram expostos aos testes de campo aberto e claro-escuro. Nestes testes, a exposição a ambientes desconhecidos provoca um conflito natural diante da nova situação, sendo a análise da atividade de exploração dos animais resultado do conflito entre o interesse em explorar o novo ambiente e a neofobia, ou seja, medo da área desconhecida (KULESSKAYA; VOIKAR, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo, não demonstraram respostas preditivas de ansiedade nos testes adotados. A literatura ainda é muito diversa com relação aos resultados de ansiedade de animais expostos ao álcool durante o desenvolvimento intrauterino, com estudos que corroboram ou não os resultados aqui reportados (BOND; DI GIUSTO, 1976; CARNEIRO, et al. 2005; DURSUN; JAKUBOWSKA-DOGRU; UZBAY, 2006; SHRESTHA; SINGH, 2013). Assim como os parâmetros apresentados anteriormente, a divergência nas respostas do presente estudo com relação à literatura pode ser justificada por variáveis como o sexo, concentração de etanol a qual os animais foram expostos, parâmetros avaliados no teste, linhagem de animais utilizada, entre outros fatores que podem exercer influências sobre a magnitude, direção e durabilidade dos efeitos do álcool sobre a prole (BECKER; DIAZ-GRANADOS; RANDALL, 1996).

Já os testes de nado forçado e suspensão pela cauda são modelos para a avaliação de comportamentos preditivos de depressão (CASTAGNÉ et al., 2010). Durante os testes o

roedor é exposto a situações experimentais inescapáveis e que geram conflito. A inserção a estes ambientes defronta o animal com o conflito entre o estresse físico e a motivação para continuar tentando a fuga. Diante desta situação, quando o estresse físico ultrapassa a motivação para a tentativa de fuga o animal adquire uma postura imóvel caracterizada como desistência e que é interpretada como comportamento preditivo de depressão (CASTAGNÉ et al., 2010).

Embora não tenham sido observadas alterações no teste de nado forçado, a exposição dos animais ao teste de suspensão pela cauda apontou significativo aumento do tempo de imobilidade, número de eventos imóveis e redução da latência para o primeiro episódio de imobilidade. Quando confrontados estes resultados com a interpretação do teste, pode-se sugerir que descendentes de mães que foram submetidas durante o período gestacional ao consumo de baixas concentrações de álcool, ao atingirem a idade adulta, apresentam prejuízos nas respostas a eventos de alta tensão, o que é evidenciado pela desistência da tentativa de fuga e caracterizado como comportamento preditivo de depressão. Até o momento não foram encontrados trabalhos que demonstrem os efeitos da exposição pré-natal ao álcool no teste de suspensão pela cauda. Contudo, embora no presente estudo não tenham sido evidenciadas alterações no nado forçado, estudos apontam aumento do tempo de imobilidade neste teste o que reforça a ocorrência de respostas preditivas de depressão em descendentes de mães que foram expostas a altas (228 mg / dL ou 35% de calorias alcoólicas) concentrações de álcool durante a gestação (BROCARDO et al., 2012; WILCOXON et al., 2005).

Visando a pesquisa dos circuitos neurais envolvidos nesta resposta, foi realizada a avaliação da ativação neuronal de estruturas encefálicas envolvidas na neurobiologia da depressão. Os resultados aqui reportados demonstram que animais do grupo álcool, apresentaram aumento da atividade neuronal com elevação da expressão de c-Fos no PVN e LC.

A avaliação do PVN foi realizada devido sua participação em respostas relacionadas ao estresse, estando este núcleo hipotalâmico envolvido na elaboração destas respostas, adaptação e manutenção da homeostasia do organismo (BENARROCH, 2005). Os neurônios deste núcleo fazem parte do chamado eixo HHA, muitas vezes identificado como "eixo do estresse". A hiperativação deste eixo (HHA), diante de situações estressoras, acarreta mudanças que contribuem para o processo depressivo (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). Este processo ocorre pela secreção de corticotrofina, que por sua vez, proporciona a síntese e liberação de glicocorticóides, que agem de forma periférica e em regiões encefálicas

acarretando efeitos no metabolismo e influenciando respostas comportamentais (CARRASCO; van de KAR, 2003). Assim, pacientes deprimidos apresentam aumento das respostas do eixo e déficits na regulação de feedback, manifestado por níveis aumentados de cortisol (HELEMENS et al., 2008).

Nesta conjuntura, o aumento da ativação neuronal no PVN, sugere que as alterações comportamentais preditivas de depressão, podem ser decorrente dos efeitos do tratamento pré-natal com álcool sobre o eixo HHA. Esta hipótese é corroborada por estudos que apontam que mesmo uma única exposição ao álcool no início da gestação já se torna suficiente para causar anomalias no eixo e consequentes alterações comportamentais na prole (WIECZOREK, et al., 2015). Embora os mecanismos responsáveis por tais respostas ainda sejam pouco elucidados, sugere-se uma reprogramação fetal do eixo HHA, o que pode elucidar a relação entre experiências adversas ou estressantes no início da vida a maior vulnerabilidade para transtornos de depressão na idade adulta (HELLEMANS, et al., 2008), sendo esta reprogramação do eixo pelo álcool, capaz de sensibilizar os mecanismos neuroadaptivos que medeiam as respostas ao estresse, resultando em hiperreatividade para eventos subsequentes, como a exposição ao teste de SPC.

Unindo a alterações no PVN, as respostas preditivas de depressão do presente estudo, também evidenciaram o aumento da atividade neuronal no LC. Neste contexto, o aumento da ativação do LC e consequentemente liberação de noradrenalina em suas regiões de projeção, durante situações de estresse atua como um sistema de alerta que está envolvido no início de respostas emocionais, autonômicas e endócrinas e que facilita a consolidação de memórias aversivas (MORILAK et. al., 2005). Dessa maneira, o aumento da atividade do LC durante o estresse pode contribuir para o desenvolvimento de consequências comportamentais, como evidenciado pela resposta dos animais expostos ao teste de SPC. Embora estas regiões (PVN e LC) apresentem distintos mecanismos de atuação na depressão, estudos apontam a existência de um circuito neural envolvido na neurobiologia depressiva, de modo que diversas estruturas podem estar integradas para regular os diferentes aspectos dessa desordem (PRICE; DREVETS, 2010).

Ainda realizando a análise da prole durante a vida adulta, os animais foram expostos ao teste de enterrar esferas. Este teste foi proposto com a finalidade de avaliar respostas preditivas de ansiedade e comportamentos compulsivos ou repetitivos, pois diante do ambiente e da presença das esferas os animais apresentam uma resposta de aversão e tendem a enterrar objetos aversivos do ambiente considerados “perigosos”, o que caracteriza este como

um comportamento defensivo (JIMENEZ-GOMEZ; OSENTOSKI; WOODS 2011; NICOLAS et al., 2006).

No presente estudo a exposição dos animais ao teste de enterrar esferas não demonstrou alteração no número de esferas escondidas, o que sugere a ausência de respostas preditivas de ansiedade e compulsividade / repetição nos animais expostos à baixa concentração de álcool na vida intrauterina. Pesquisas que avaliaram respostas tipo compulsivas / repetitivas em animais expostos na vida intrauterina ao álcool, observaram aumento do número de esferas escondidas após associação do álcool com períodos de estresse na gestação, o que difere do presente estudo que não houve a associação destes fatores (MOROZOVA; POPOVA, 2012; POPOVA et al., 2011).

Também a exposição dos animais ao teste de preferência social, avaliado através do aparato de três câmaras, não evidenciou alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados, quando comparados animais do grupo álcool aos controles.

Pesquisa em humanos demonstra que 58 % dos indivíduos com diagnóstico de SAF ou DEAF apresentam dificuldades na integração social e desenvolvem problemas com a lei (STREISSGUTH et al., 1996). Unindo-se a este trabalho, estudos animais também indicam que a exposição a altas concentrações de álcool durante a gestação acarreta alteração na memória de reconhecimento social e na interação social (KELLY; DILLINGHAM, 1994; KELLY; TRAN, 1997; LUGO et al., 2003). Acrescentando informações aos efeitos da exposição pré-natal no comportamento social, pesquisas demonstram que a exposição aguda (dia gestacional 12 ou 15) a altas concentrações de álcool também provoca déficits pronunciados e permanentes no desempenho social da prole durante a vida adulta (DIAZ; MOONEY; VARLINSKAYA, 2016; MIDDLETON; VARLINSKAYA; MOONEY, 2011; MOONEY; VARLINSKAYA, 2011; VARLINSKAYA; MOONEY, 2014). Neste contexto, embora no presente estudo os animais não tenham evidenciado alterações durante avaliação da preferencial social, tal resultado também pode ser decorrente da concentração de álcool a qual os animais foram expostos, isto porque todas as pesquisas citadas obtiveram altos níveis de álcool no sangue dos animais, sugerindo que a divergência nas respostas pode ser relacionada a esta variável.

Já com relação à avaliação do comportamento sexual durante a vida adulta, os resultados demonstraram alterações na preferência pelo incentivo sexual da prole masculina e feminina de ratas expostas ao álcool. Estas alterações podem ser relacionadas aos padrões de atratividade sexual pelo parceiro sexual e a capacidade do indivíduo de reconhecer esses padrões através do sistema somatossensorial. Isto porque, em roedores, a preferência pelo

parceiro sexual é mediada, em parte, pelos efeitos dos odores que atuam no órgão vomeronasal (BAKKER; VAN OPHEMERT; SLOB, 1996) e estudos demonstraram que o consumo materno de álcool altera o comportamento e as respostas dos animais a sinais olfatórios (GASS et al., 2007) e causa alterações no córtex somatossensorial (MARGRET et al., 2005).

Além de prejuízos sensoriais, estudos também já demonstraram que a exposição pré-natal ao álcool pode acarretar alterações no núcleo accumbens, que possui uma importante relação com os aspectos motivacionais do comportamento sexual em mulheres (JENKINS; BECKER, 2001). Também, como citado anteriormente, a exposição intrauterina ao álcool, já foi associada à redução da ramificação dendrítica e do comprimento de neurônios nesta região (RICE et al., 2012).

Unido a mudanças na área crítica para a motivação do comportamento sexual, autores também apontam que descendentes de mães que consumiram álcool durante a gestação podem apresentar prejuízos no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, sendo seus hormônios essenciais para o desenvolvimento puberal e comportamento sexual (MCGIVERN; YELLON, 1992). Além dessa hipótese, alterações nos níveis de testosterona durante e / ou após o desenvolvimento intrauterino são relacionados a comportamentos sexuais atípicos em ratos exposto na vida intrauterina ao álcool, o que também poder justificar os resultados obtidos (CARTER et al., 2014; MCGIVERN; YELLON, 1992; WARD et al., 2002).

Diante dos resultados apresentados, o presente estudo contribui significativamente para a definição das anormalidades anatômicas e funcionais que podem ocorrer na prole mesmo após o consumo de baixas concentrações de álcool durante a gestação, apresentando relevância clínica, pois enfatiza a importância de evitar o consumo de qualquer quantidade de álcool durante a gravidez, além de acrescentar informações que possibilitam a melhora do diagnóstico das DEAF.

9 CONCLUSÃO

A exposição crônica à baixa concentração de álcool durante a vida intrauterina é capaz de acarretar danos pós-natais a prole, evidenciados pelo alto índice de óbito após o nascimento, baixo peso ao nascer, redução do peso e comprimento até o início da vida adulta e atrasos no desenvolvimento físico e reflexo. As consequências há longo prazo da exposição pré-natal ao álcool, foram evidenciadas por prejuízos no comportamento de socialização durante a adolescência e atenuação da ativação neuronal de áreas centrais relacionadas a estas respostas e respostas preditivas de depressão manifestadas por aumento da ativação neuronal em regiões relacionadas ao estresse. Ainda na vida adulta, a prole masculina e feminina apresentou alterações dos padrões de preferência ao incentivo sexual durante a vida adulta.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. W.; KOZANIAN, O. O.; KANAAN, J.; WENDEL, K. M.; HUFFMAN, K.J. The impact of prenatal ethanol exposure on neuroanatomical and behavioral development in mice. **Alcoholism: clinical and experimental research**, Malden, v. 40, n.1, p. 122-133, 2016.

ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of Depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 35, p. S112–S120, 2013.

ABEL, E. Consumption of alcohol during pregnancy: A review of effects on growth and development of offspring. **Human Biology**, Detroit, v. 54, n. 3, p. 421-453, 1982.

ABEL, E. L. Effects of alcohol withdrawal and undernutrition on cannibalism of rat pups. **Behavioral and neural biology**, New York, v. 25, p. 411-413, 1979.

ABEL, E. L. Effects of prenatal alcohol exposure on birth weight in rats: is there an inverted u-shaped function? **Alcohol**, Indianapolis, v. 13, n. 1, p. 99-102, 1996.

ABEL, E. L. Maternal alcohol consumption and spontaneous abortion. **Alcohol & Alcoholism**, London, v. 32, n. 3, p. 211-219, 1997.

ABEL, E. L.; DINTCHEFF, B. A. Effects of prenatal alcohol exposure on growth and development in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 207, p. 916-921, 1978.

ÁGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Research. Brain Research Protocols**, Boston, v. 1, p. 203-209, 1997.

ÁGMO, A. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v. 117, p. 3 -14, 2003.

ARCHIBALD, S.L.; FENNEMA-NOTESTINE, C.; GAMST, A.; RILEY, E.P.; MATTSON, S.N.; JERNIGAN, T.L. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. **Developmental Medicine & Child Neurology**, Malden, v. 43, p.148–154, 2001.

ARONNE, M. P.; GUADAGNOLI T.; FONTANET, P.; EVRARD, S., G.; BRUSCO, A. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. **Experimental Neurology**, Baltimore, v. 229, p. 364-371, 2011.

AROS, S.; MILLS, J. L.; IÑIGUEZ, G.; AVILA, A.; CONLEY, M. R.; TROENDLE, J.; COX, C.; CASSORLA, F. Effects of prenatal ethanol exposure on postnatal growth and the insulin-like growth factor axis. **Hormone Research Paediatrics**, Basel, v.75, p. 166-173, 2011.

ASTOVIZA, M.; SUÁREZ, M. M. S. Revisión: El alcoholismo, consecuencias e prevención. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, Havana, v. 22, n. 1, p. 25-31, 2003.

ÁVILA, M. A. P.; MARTHOS, G. C. P.; OLIVEIRA, L. G. M.; FIGUEIREDO, E. C.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Effect of prenatal ethanol exposure on sexual motivation in adult rats. **Alcohol**, Indianapolis, v. 54, p. 11-16, 2016.

BADGUJAR, V. B.; SURANA, S. J. Anxiolytic effects of *Dolichandrone falcata* Seem., Bignoniaceae, stem-bark in elevated plus maze and marble burying test on mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 773-780, 2010.

BAKKER, J.; VAN OPHEMERT, J.; SLOB, A. K. Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. **Physiology & Behavior**, Zurich, v. 60, p. 489- 494, 1996.

BARNES, D. E.; WALKER, D. W. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 1, p. 333-340, 1981.

BARR, H. M.; STREISSGUTH, A. P. Identifying Maternal Self-Reported alcohol Use Associated With Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 25, n. 2, p. 283-287, 2001.

BECKER, H. C.; DIAZ-GRANADOS, J. L.; RANDALL, C. L. Teratogenic actions ethanol in the mouse: A minireview. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 501-513, 1996.

BENARROCH, E. E. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clinical Autonomic Research**, Cham, v. 15, n.4, p. 254-63, 2005.

BERTRAND, J.; FLOYD, R. L.; WEBER, M. K. Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 54, n. RR11, p. 1-14, 2005.

BISHOP, S.; GAHAGAN, S.; LORD, C. Re-examining the core features of autism: a comparison of autism spectrum disorder and fetal alcohol spectrum disorder. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, Hoboken, v. 48, n. 11, p. 1111-1121, 2007.

BLANCHARD, B. A.; HANNIGAN, J. H. Prenatal ethanol exposure: effects on androgen and nonandrogen dependent behaviors and on gonadal development in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, Utrecht, v. 16, n. 1, p. 31-39, 1994.

BLANCHARD, B. A.; HANNIGAN, J.H.; RILEY, E.P. Amphetamine-induced activity after fetal alcohol exposure and undernutrition in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, Utrecht, v. 9, p. 113-119, 1987.

BOND, N. W.; DI GIUSTO, E. L. Effects of prenatal alcohol consumption on open-field behaviour and alcohol preference in rats. **Psychopharmacologia**, Cham, v. 46, n. 2, p.163-165, 1976.

BOSCO, C.; DIAZ, E. Pharmacology and cell metabolism: Placental hypoxia and foetal development versus alcohol exposure in pregnancy. **Alcohol and Alcoholism**, London, v. 47, n. 2, p. 109-117, 2012.

BREESE, C. R.; D’COSTA, A.; INGRAM, R. L.; LENHAM, J.; SONNTAG, W. E. Long-term suppression of insulin-like growth factor-1 in rats after in utero ethanol exposure: relationship to somatic growth. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 264, n. 1, 1993.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Amsterdam, v. 36, p. 178-196, 2015.

BROCARD, P. S.; BOEHME, F.; PATTEN, A.; COX, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE B. R. Anxiety-and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. **Neuropharmacology**, Amsterdam, n. 62, p. 1607-1618, 2012.

BURD, L.; ROBERTS, D.; OLSON, M.; ODENDAAL, H. Ethanol and the placenta: A review. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, Perugia, v. 20, n. 5, p. 361-375, 2007.

CALDWELL, K. K.; SHEEMA, S.; PAZ, R. D.; SAMUDIO-RUIZ, S. L.; LAUGHLIN, M. H.; SPENCE, N. E.; ROEHLK, M. J.; ALCON, S. N.; ALLAN, A. M. Fetal Alcohol Spectrum Disorder-associated depression: evidence for reductions in the levels of brain-derived neurotrophic factor in a mouse model. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 614-624, 2008.

CARRASCO, G. A.; van de KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 235-272, 2003.

CARNEIRO, L. M. V.; DIOGENES, J. P. L.; VASCONCELOS, S. M. V.; ARAGÃO, G. F.; NORONHA, E. C.; GOMES, N. P.; VIANA, G. S. B. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. **Neurotoxicology and teratology**, Amsterdam, v. 27, p. 585-592, 2005.

CARTER, R. C.; , JOSEPH L. JACOBSON, J. L.; ROBERT J. SOKOL, R. J.; MALCOLM J. AVISON, M. J.; SANDRA W. JACOBSON, S. W. Fetal alcohol-related growth restriction from birth through young adulthood and moderating effects of maternal pregnancy weight. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 37, n. 3, p. 452-462, 2013.

CARTER, R. C.; JACOBSON, J. L. DODGE, N. C.; GRANGER, D. A.; JACOBSON, S. W. Effects of prenatal alcohol exposure on testosterone and pubertal development. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 38, n. 6, p. 1671-1679, 2014.

CARTER, R. C.; JACOBSON, J. L.; MOLTENO, C. D.; DODGE, N. C.; MEINTJES, E.M.; JACOBSON, S. W. Fetal Alcohol Growth Restriction and Cognitive Impairment. **Pediatrics**, Cincinnati, v. 138, n. 2, p. 1-9, 2016.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Pharmacology**, Kansas, p. 5.8.1-5.8.14, 2010.

CHARNESS, M.E.; SAFRAN, R.M.; PERIDES, G. Ethanol inhibits neural cell-cell adhesion. **The Journal Biology Chemistry**, [S.I.:s.n.], v. 269, p. 9304-9309, 1994.

CHEN, J. S.; DRISCOLL, C. D.; RILEY, E. P. Ontogeny of suckling behavior in rats prenatally exposed to alcohol. **Teratology**, Malden, v. 26, p. 145-153, 1982.

CHEN, W.J.; MAIER, S. E.; PARNELL, S. E.; WEST, J. R. Alcohol and developing brain: neuroanatomical studies. **Alcohol Res Health**, [S.I.:s.n.], v. 27, p.174-80, 2003.

CHOTRO, M. G.; ARIAS, C.; LAVIOLA, G. Increased ethanol intake after prenatal ethanol exposure: Studies with animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S.I.:s.n.], v.31, p.181-191, 2007.

CHUDLEY, A. E.; CONRY, J.; COOK, J. L.; LOOCK, C.; ROSALES, T.; LEBLANC, N. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. **CMAJ**, [S.I.:s.n.], v. 172, n. 5, p. 51-71, 2005.

CLARKE, M. E.; GIBBARD, W. B. Overview of Fetal Alcohol Spectrum Disorders for Mental Health Professionals. **The Canadian Child Adolescent Psychiatry Review**, Toronto, v. 12, n.3, p. 57-63, 2003.

CLARREN, S. K.; ALVORD, E. C. JR.; SUMI, S. M.; STREISSGUTH, A. P.; SMITH, D. W. Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. **Journal Pediatric**, [S.I.:s.n.], v. 92, n.1, p. 64-67, 1978.

CLAUSING, P.; FERGUSON, S. A.; HOLSON, R. R.; ALLEN, R. A.; PAULE, M. G. Prenatal Ethanol Exposure in Rats: Long-Lasting Effects on Learning. **Neurotoxicology and Teratology**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 545-552, 1995.

COLLINS, A. C.; YEAGER, T. N.; LEBSACK, M. E.; PANTER, S. S. Variations in alcohol metabolism: influence of sex and age. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, [S.I.:s.n.], v. 3, p. 973-978, 1975.

COOMBS, E. J. Assessing the effects of environmental enrichment on behavioural deficits in C57BL mice. **Altern Lab Anim**, [S.I.:s.n.], v. 42, n. 2, p. 18-22, 2014.

CULLEN, C. L.; BURNE, T. H. J.; LAVIDIS, N. A.; MORITZ, K. M. Low dose prenatal ethanol exposure induces anxiety-like behaviour and alters dendritic morphology in the basolateral amygdala of rat offspring. **Plos one**, São Francisco, v. 8, n.1, 2013.

CULLEN, C. L.; BURNE, T. H. J.; LAVIDIS, N. A.; MORITZ, K. M. Low dose prenatal alcohol exposure does not impair spatial learning and memory in two tests in adult and aged rats. **Plos one**, São Francisco, v. 9, p. 1-9, 2014.

CURLEY, J. P.; CHAMPAGNE, F. A. Influence of Maternal Care on the Developing Brain: Mechanisms, Temporal Dynamics and Sensitive Periods. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Amsterdam, v.1, p. 1-66, 2015.

DAMASCENO, D.C.; KEMPINAS, W. G.; VOLPATO, G. T.; CONSONNI, M; RUDGE, M. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. 2008. **Anomalias congênitas: estudos experimentais**. Belo Horizonte, COOPMED, 102p.

DESROCHES, D.; OREVILLO C.; VERINA, D. Sex- and Strain-Related Differences in First-Pass Alcohol Metabolism in Mice. **Alcohol**, Indianapolis, v. 12, n. 3, p. 221-226, 1995.

DEVAUD, L.L.; CHADDA, R. Sex differences in rats in the development of and recovery from ethanol dependence assessed by changes in seizure susceptibility. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 25, p. 1689–1696, 2001.

DIAZ, M. R.; MOONEY, R. M.; VARLINSKAYA, E. I. Acute prenatal exposure to ethanol on gestational day 12 elicits opposing deficits in social behaviors and anxiety-like behaviors in Sprague Dawley rats. **Behavioural Brain Research**, Düsseldorf, v. 310, p. 11-19, 2016.

DOUKKALI, Z.; TAGHZOUTI, K.; BOUIDIDA, E. H.; NADJMOUDDINE, M.; CHERRAH, Y.; ALAOUI, K. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behavioral and Brain Functions**, [S.I.:s.n.], v. 11, n. 19, p. 1-5, 2015.

DREOSTI, I. E. Nutritional factors underlying the expression of the fetal alcohol syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 678, p. 193-204, 1993.

DURSUN, I.; JAKUBOWSKA-DOGRU, E.; UZBAY, T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [S.I.:s.n.], v. 85, p. 345-355, 2006.

ENDRES, M.; TOSO, L.; ROBERSON, R.; PARK, J.; ABEBE, D.; POGGI, S.; C. Y. SPONG, C. Y. Prevention of alcohol-induced developmental delays and learning abnormalities in a model of fetal alcohol syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Amsterdam, v.193, p. 1028-1034, 2005.

FALGREEN ERIKSEN, H-L.; MORTENSEN, E. L.; KILBURN, T. R.; UNDERBJERG, M.; BERTRAND, J.; STØVRING, H.; WIMBERLEYE, T.; GROVEA, J.; KESMODELA, U. S. The effects of low to moderate prenatal alcohol exposure in early pregnancy on IQ in 5-year- old children. **BJOG**, [S.I.:s.n.], v. 119, n.10, p. 1191-200, 2012.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19 (1), p. 59-65, 2004.

FAKOYA, F.A. Persistent neocortical astrogliosis in adult wistar rats following prenatal ethanol exposure. **Brain and Development**, [S.I.:s.n.], v. 27, p. 259-265, 2005.

FERRARI, R; GABRIELLI, P.R.M.; MELLO, M.A. Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe/feto. Um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.4, p. 45-56, 1992.

FIEBRE, N. C.; FIEBRE, C. M. Freely accessible water does not decrease consumption of ethanol liquid diets. **Alcohol**, Indianapolis, v, 29; p. 61-68, 2003.

FISH, E. W.; HOLLOWAY, H. T.; RUMPLE, A.; BAKER, L. K.; WIECZOREK, L. A.; MOY, S. S.; PANIAGUA, B.; PARNELL, S. E. Acute alcohol exposure during neurulation: Behavioral and brain structural consequences in adolescent C57BL/6J mice. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 311, p. 70-80, 2016.

FLOYD, R. L.; O'CONNOR, M. J.; SOKOL, R. J.; BERTRAND, J.; CORDERO, J.F. Recognition and Prevention of Fetal Alcohol Syndrome. **Obstetrics & gynecology**, [S.I.:s.n.], v. 106, n. 5, p. 1059-1064, 2005.

FRANCIS, D.; DIORIO, J.; LIU, D.; MEANEY, M. J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, Washington, v. 286, p. 1155-1158, 1999.

FREIRE, T. M.; MACHADO, J. C.; MELO, E. V.; MELO, D. G. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 376-381, 2005.

GASS, J. T.; JENKINS, W. J.; MARINO, M. D.; LUGO, J. N., JR.; KELLY, S. J. Alcohol exposure during development: analysis of effects on female sexual behavior. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 31, p. 2065 - 2072 , 2007.

GEVA, D.; GOLDSCHMIDT, L.; STOFFER, D.; DAY, N. L. A longitudinal analysis of the effect of prenatal alcohol exposure on growth. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 17, n. 6, p. 1124-1129, 1993.

GOODLETT, C. R.; HORN, K. H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. **Alcohol Research & Health**, [S.I.:s.n.], v. 25, n. 3, p. 175-184, 2001.

GOTTESFELD, Z.; SILVERMAN, P. B. Developmental delays associated with prenatal alcohol exposure are reversed by thyroid hormone treatment. **Neuroscience Letters**, [S.I.:s.n.], v. 109, p. 42-47, 1990.

GREEN, C.R. ; MIHIC, A.M.; NIKKEL, S.M.; STADE, B.C.; RASMUSSEN, C.; MUNOZ, D.P.; REYNOLDS, J.N. Executive function deficits in children with fetal alcohol spectrum disorders (FASD) measured using the Cambridge Neuropsychological Tests Automated Battery (CANTAB). **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, [S.I.:s.n.], v. 50 (6), p. 688-697, 2009.

GUERRI, C.; PASCUAL, M.; RENAU-PIQUERAS, J. Glia and fetal alcohol syndrome. **Neurotoxicology**, [S.I.:s.n.], v. 22, p. 593-599, 2001.

GUPTA, K., K.; GUPTA, V., K.; SHIRASAKA, T. An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment . **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. ** (*), p. 1-9, 2016.

HAMILTON, D. A.; AKERS, K. G; RICE, J. P.;JOHNSON, T. E.; CANDELARIA-COOK, F. T.; MAES, L. I.; ROSENBERG, M.; VALENZUELA, F.; SAVAGE, D. D. Prenatal exposure to moderate levels of ethanol alters social behavior in adult rats: Relationship to structural plasticity and immediate early gene expression in frontal cortex. **Behavior Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 207, n. 2, p. 290, 2010.

HANNIGAN, J. H. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. **Pharmacology biochemistry and behavior**, [S.I.:s.n.], v. 55, p. 489-99, 1996.

HANNIGAN, J. H.; FITZGERALD, L. W.; BLANCHARD, B. A.; RILEY, E. P. Absence of differential motoric and thermic responses to clonidine in young rats exposed prenatally to alcohol. **Alcohol**, Indianapolis, v. 5, p. 431-436, 1988.

HELLEMANS, K. G. G.; VERMA, P.; YOON, E.; YU, W.; WEINBERG, J. Prenatal alcohol exposure increases vulnerability to stress and anxiety-like disorders in adulthood. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S.I.:s.n.], v. 1144, p. 154-175, 2008.

HENRIKSEN, T. B.; HJOLLUND, N. H.; JENSEN, T.K.; BONDE, J. P.; ANDERSSON, A. M., KOLSTAD, H.; ERNST, E.; GIWERCMAN, A.; SKAKKEBAEK, N. E.; OLSEN, J. Alcohol Consumption at the Time of Conception and Spontaneous Abortion. **American journal of epidemiology**, [S.I.:s.n.], v. 160, n. 7, p. 661-667, 2004.

HOMBERG, J. R.; SCHIEPERS, O. J. G.; SCHOFFELMEER, A. N. M.; CUPPEN, E.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J. Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. **Psychopharmacology**, [S.I.:s.n.], v. 195, p. 175-182, 2007.

HOYME, H. E.; MAY, P. A.; KALBERG, W. O.; KODITUWAKKU, P.; GOSSAGE, J. P.; TRUJILLO, P. M.; BUCKLEY, D. G.; MILLER, J. H.; ARAGON, A. S.; KHAOLE, N.; VILJOEN, D. L.; JONES, K. L.; ROBINSON, L. K. A Practical Clinical Approach to Diagnosis of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Clarification of the 1996 Institute of Medicine Criteria. **Pediatrics**, Cincinnati, v. 115, n. 1, p. 39-47, 2005.

IKEMOTO, S.; PANKSEPP, J. The effects of early social isolation on the motivation for social play in juvenile rats. **Developmental Psychobiology**, [S.I.:s.n.], v. 25, n. 4, p. 261-274, 1992.

IKEMOTO, S.; PANKSEPP, J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. **Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 31, p. 6- 41, 1999.

IKONOMIDOU, C. et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. **Science**, Washington, v. 287, p. 1056-1060, 2000.

JIMENEZ-GOMEZ, C.; OSENTOSKI, A.; WOODS, J. H. Pharmacological evaluation of the adequacy of marble burying as an animal model of compulsion and/or anxiety. **Behavior Pharmacology**, [S.I.:s.n.], v. 22, n. 7, p. 711-713, 2011.

JONES, K.L. et al. Pattern of malformation in offspring of chronic alcohol women. **Lancet**, [S.I.:s.n.], v. 1, p. 1267-1271, 1973.

KEHOE, P.; SHOEMAKER, W. Opioid-dependent behaviors in infant rats: effects of prenatal exposure to ethanol. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, [S.I.:s.n.], v. 39, p. 389-394, 1991.

KELLY, S. J.; BONTHIUS, D. J.; WEST, J. R. Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v.11 , n. 3, p 281-286, 1987.

KELLY, S. J.; DAY, N.; STREISSGUTH, A. P. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. **Neurotoxicology and Teratology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 143-149, 2000.

KELLY, S.J.; DILLINGHAM, R.R. Sexually dimorphic effects of perinatal alcohol exposure on social interactions and amygdala DNA and DOPAC concentrations. **Neurotoxicology and Teratology**, Amsterdam, v. 16, p. 377–384, 1994.

KELLY, S. J.; GOODLETT, H. R.; HANNIGAN, J. H. Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. **Developmental Disabilities Research Reviews**, [S.I.:s.n.], v. 15, p. 200-208, 2009.

KELLY, S. J.; TRAN, T. D. Alcohol exposure during development alters social recognition and social communication in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 383-389, 1997.

KESMODEL, S. U.; BERTRAND, J.; STØVRING, H.; SKARPNESS, B.; DENNY, C. K.; MORTENSEN, E. L.; LIFESTYLE DURING PREGNANCY STUDY GROUP. The effect of different alcohol drinking patterns in early to mid-pregnancy on child's intelligence, attention and executive function. **BJOG**, [S.I.:s.n.], v. 119, n. 10, p. 1180–1190, 2012.

KILBURN, T.R.; ERIKSEN, H. L.; UNDERBJERG, M.; THORSEN, P.; MORTENSEN, E. L.; LANDRØ, N. I.; BAKKETEIG, L. S.; GROVE, J.; SVÆRKE, C.; KESMODEL, U. S. Low to Moderate Average Alcohol Consumption and Binge Drinking in Early Pregnancy: Effects on Choice Reaction Time and Information Processing Time in Five- Year-Old Children. **PLoS One**, São Francisco, v. 10, n. 9, p. e0138611, 2015.

KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology & Behavior**, Zurich, v. xx, p. 1-9, 2014.

LARANJEIRA, R. (Supervisão). **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD)**– 2012. [et al.], São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool E Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014.

LAZIC, S. E.; ESSIUX, L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. **Neuroscience**, [S.I.:s.n.], v. 14, n. 37, p. 1-11, 2013.

LAWRENCE, R. C., BONNER, H.C., NEWSOM, R.J., KELLY, S. J. Effects of alcohol exposure during development on play behavior and c-Fos expression in response to play. **Behavioural Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 188, p. 209-218, 2007.

LEE, M. H.; RABE, A. Infantile handling eliminates reversal learning deficit in rats prenatally exposed to alcohol. **Alcohol**, Indianapolis, v. 18, n. 1, p. 49–53, 1999.

LEMOINE, P.; HAROUSEAU, H.; BORTERYU, J. T.; MENUET, J. C. Historical Perspective. Children of Alcoholic Parents - Observed Anomalies: Discussion of 127 Cases. **Therapeutic Drug Monitoring**, [S.I.:s.n.], v. 25, p. 132-136. 2003.

LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. Liquid diet technique of ethanol administration. **Alcohol**, Indianapolis, v. 24, p. 197-211, 1989.

LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. The Feeding of Alcohol in Liquid Diets: Two Decades of Applications and 1982 Update. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 6, n. 4, p.523-531, 1982.

LIEBERMAN, D. Z. Children of alcoholics: an update. **Current Opinion in Pediatrics**, [S.I.:s.n.], v. 12, p. 336-340, 2000.

LUGO, J. N.; MARINO, M. D.; CRONISE, M. K.; KELLY, S. J. Effects of alcohol exposure during development on social behavior in rats. **Physiology & Behavior**, Zurich, v. 78, p. 185-194, 2003.

LUNDSBERG, L. S.; ILLUZZI, J. L.; BELANGER, K.; TRICHE, E.W.; BRACKEN, M. B. Low to moderate prenatal alcohol consumption and the risk of selected birth outcomes: a prospective cohort study. **Ann Epidemiol**, [S.I.:s.n.], v. 25, n. 1, p. 46-54, 2015.

MAIER, S. E.; MILLER, J. A.; BLACKWELL, J.M.; WEST, J.R. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. n.4, p. 726-734, 1999.

MAIER, S. E. STRITTMATTER, M. A.; CHEN, W. A.; WEST, J. R. Changes in blood alcohol levels as a function of alcohol concentration and repeated alcohol exposure in adult female rats: potential risk factors for alcohol-induced fetal brain injury. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v.19 , n. 4, p 923-927, 1995.

MAIER, S. E.; WEST, J. R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. **Alcohol Res Health**, [S.I.:s.n.], v. 25, n. 3, p. 168-74, 2001.

MAIO, R.; DICHI, J. B.; BURINI, R. C. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes+. **Arquivos de Gastroenterologia**, [S.I.:s.n.], v. 37, n. 2, p. 120-124, 2000.

MANCINELLI, R.; BINETTI, R.; CECCANTI, M. Female drinking environmental biological markers. **Ann Ist Super Sanita**, [S.I.:s.n.], v. 42, p. 31-38, 2006.

MARGRET, C. P.; LI, C. X.; ELBERGER, A. J.; MATTA, S. G.; CHAPPELL, T. D.; WATERS, R. S. Prenatal alcohol exposure alters the size, but not the pattern, of the whisker representation in neonatal rat barrel cortex. **Experimental Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 165, p. 167 – 178, 2005.

MARINO, M. D.; CRONISE, K.; LUGO, J. N. JR.; KELLY, S. J. Ultrasonic vocalizations and maternal-infant interactions in a rat model of fetal alcohol syndrome. **Developmental Psychobiology**, [S.I.:s.n.], v. 41, n. 4, p. 341-351, 2002.

MARISCAL, M.; PALMA, S.; LLORCA, J.; PÉREZ– GLESIAS, R.; PARDO–CRESPO, R.; DELGADO–RODRÍGUEZ, M. Pattern of alcohol consumption during pregnancy and risk for low birth weight. **AEP**, [S.I.:s.n.], v. 16, n. 6, p. 432-438, 2006.

MARQUARDT, K.; BRIGMAN, J. L. The impact of prenatal alcohol exposure on social, cognitive and affective behavioral domains: Insights from rodent models. **Alcohol**, Indianapolis, v. 51, p. 1-15, 2016.

MATTSON, S. N.; GOODMAN, A. M.; CAINE, C.; DELIS, D.C.; RILEY, E. P. Executive Functioning in Children With Heavy Prenatal Alcohol Exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 123, n. 11, p. 1808-1815, 1999.

McFARLANE, H. G.; KUSEK, G. K.; YANG, M.; J. L. PHOENIX, J. L.; BOLIVAR, V. J.; CRAWLEY, J. N. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T1tf/J mice. **Genes, Brain and Behavior**, [S.I.:s.n.], v. 7, p. 152-163, 2008.

McGIVERN, R. F.; YELLON, S. Y. Delayed onset of puberty and subtle alterations in GnRH neuronal morphology in female rats exposed prenatally to ethanol. **Alcohol**, Indianapolis, v. 9, p. 335-340, 1992.

McMURRAY, M. S.; WILLISNS, S. K.; JARRET, T. M.; COX, E. T.; FAY, E. E.; OVERSTREET, D. H.; WALKER, C. H.; JOHNS, J. M. Gestational ethanol and nicotine exposure: effects on maternal behavior, oxytocin, and offspring ethanol intake in the rat. **Neurotoxicol Teratol**, [S.I.:s.n.], v. 30, n. 6, p. 475-486, 2008.

MESQUITA, M. A. Efeitos do álcool no recém-nascido. **Einstein**, São Paulo, v. 8 n. 3 (Pt 1), p. 368-75, 2010.

MEYER, L. S.; RILEY, E. P. Social Play in Juvenile Rats Prenatally Exposed to Alcohol. **Teratology**, Malden, v. 34, p. 1-7, 1986.

MIDDAUGH, L. D.; BOGGAN, W. O. Perinatal maternal ethanol effects on pregnant mice and on offspring viability and growth: influences of exposure time and weaning diet. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v.19 , n. 5, p 1351-1358, 1995.

MIDDAUGH, L. D.; BOGGAN, W. O. Postnatal growth deficits in prenatal ethanol- exposed mice: characteristics and critical periods. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden,v. 15, n. 6, 1991.

MIDDLETON, F. A.; VARLINSKAYA, E. I.; MOONEY, S. M. Molecular substrates of social avoidance seen following prenatal ethanol exposure and its reversal by social enrichment. **Developmental Neuroscience**, [S.I.:s.n.], v. 34, p. 115-128, 2012.

MILLS, J.L.; GRAUBARD, B. I. Is Moderate Drinking During Pregnancy Associated With an Increased Risk for Malformations? **Pediatrics**, Cincinnati,v. 80, p. 309-314, 1987.

MITCHELL, J. A. Effects of alcohol on blastocyst implantation and fecundity in the rat. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1994.

MOONEY, S. M.; VARLINSKAYA, E. I. Acute prenatal exposure to ethanol and social behavior: effect of age, sex, and timing of exposure. **Behavior Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 216, n. 1, p. 358-364, 2011.

MORILAK, D. A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; GARCIA, A. S.; HERNANDEZ, A. M. A. S.; PETRE, C. O .Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, [S.I.:s.n.], v. 29, p. 1214-1224, 2005.

MOROZOVA, M. V.; POPOVA, N. K. Combined effects of alcohol and stress during the prenatal period on behavior in adult mice. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, [S.I.:s.n.], v. 42, n. 3, p. 317-321, 2012.

MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, [S.I.:s.n.], v. 27, p. 529-533, 2005.

MUKHERJEE, R. A. S.; HOLLINS, S.; TURK., J. Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. **J R Soc Med**, [S.I.:s.n.], v. 99, p.298-302, 2006.

NAKATANI, J.; TAMADA, K.; ISE, F. H. S.; OHTA, H.; INOUE, K.; TOMONAGA, S.; WATANABE, Y.; CHUNG, Y. J.; BANERJEE, R.; IWAMOTO, K.; KATO, T.; OKAZAWA, M.; YAMAUCHI, K.; TANDA, K.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T.; TAKUMI, A. B. T. Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. **Cell**, [S.I.:s.n.], v. 137, p. 1235-1246, 2009.

NESS, J. W.; FRANCHINA, J. J. Effects of prenatal alcohol exposure on rat pups' ability to elicit retrieval behavior from dams. **Developmental Psychobiology**, [S.I.:s.n.], v. 23, n. 1, p. 85-99, 1990.

NEWPORT, D. J.; STOWE, Z. N.; NEMEROFF, C. B. Parental depression: animal models of an adverse life event. **The American Journal Psychiatry**, [S.I.:s.n.], v. 159, p.1265-1283, 2002.

NICOLÁS, J. M.; FERNÁNDEZ-SOLÀ, J.; FATJÓ, F.; CASAMITJANA, R.; BATALLER, R.; SACANELLA, E. TOBÍAS, E.; BADÍA, E.; ESTRUCH, R. Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 25, n. 1, 2001.

NICOLAS, L. B.; KOLB, Y.; PRINSSSEN E. P. M. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **European Journal of Pharmacology**, [S.I.:s.n.], n. 547, p. 106-115, 2006.

NOLDUS, L. P. J. J.; J. SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, [S.I.:s.n.], v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.

O'CONNOR, M., J.; KOGAN, N.; FINDLAY, R. Prenatal alcohol exposure and attachment behavior in children. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 26, n. 10, p. 1592-1602, 2002.

ORNOY, A.; ERGAZ, Z. Alcohol Abuse in Pregnant Women: Effects on the Fetus and Newborn, Mode of Action and Maternal Treatment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, [S.I.:s.n.], v. 7, p. 364-379, 2010.

PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social Deprivation and Play in Rats. **Behavioral And Neural Biology**, New York, n. 30, p. 197-206, 1980.

PASSINI JUNIOR, R. Alcohol consumption during pregnancy. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 373-375, 2005.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, New York, 2001.

POPOOLA, D. O.; BORROW, A. P.; SANDERS, J. E.; NIZHNIKOV, M. E.; CAMERON, N. M. Can low-level ethanol exposure during pregnancy influence maternal care? An investigation using two strains of rat across two generations. **Physiology Behavior**, v. 1 n. 148, p. 111-121, 2015.

POPOVA, N. K.; MOROZOVA, M. V.; NAUMENKO, V. S. Ameliorative effect of BDNF on prenatal ethanol and stress exposure-induced behavioral disorders. **Neuroscience Letters**, [S.I.:s.n.], v. 505, p. 82-86, 2011.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, [S.I.:s.n.], v. 35, p. 192-216, 2010.

PROBYN, M. E.; ZANINI, S.; WARD, L. C.; BERTRAM, J. F.; MORITZ, K. M. A rodent model of low- to moderate-dose ethanol consumption during pregnancy: patterns of ethanol consumption and effects on fetal and offspring growth. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.I.:s.n.], v. 24, p. 859-870, 2012.

RAO, G. A.; LARKIN, E. C. Inadequate intake by growing rats of essential nutrients from liquid diets used for chronic alcohol consumption. **Nutrition Research**, [S.I.:s.n.], v. 5, p. 789-796, 1985.

RASMUSSEN, C. Executive Functioning and Working Memory in Fetal Alcohol Spectrum Disorder. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 29, n. 8, p. 1359–1367, 2005.

RICE, J. P.; SUGGS, L. E.; LUSK, A. V.; PARKER, M. O.; CANDELARIA-COOK, F. T.; AKERS, K. G.; SAVAGE, D. D.; HAMILTON, D. A. Effects of exposure to moderate levels of ethanol during prenatal brain development on dendritic length, branching, and spine density in the nucleus accumbens and dorsal striatum of adult rats. **Alcohol**, Indianapolis, v. 46, n. 6, p. 577-584, 2012.

ROEBUCK, T. M.; MATTSON, S. M.; RILEY, E. P. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 22, n. 2, 1998.

ROOM, R.; BABOR, T.; REHM, J. Alcohol and public health. **Lancet**, [S.I.:s.n.], v. 365, p. 519-530, 2005.

ROOZEN, S.; PETERS, G. Y.; KOK, G.; TOWNEND, D.; NIJHUIS, J.; CURFS, L. Worldwide Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A Systematic Literature Review Including Meta-Analysis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 40, n. 1, p. 18-32, 2016.

SALAMONE, J. D.; The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. **Behavioural Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 61, p. 117- 133, 1994.

SALGADO, S.; KAPLITT, M. G. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. **Stereotact Funct Neurosurg**. [S.I.:s.n.], v. 93, p.75-93, 2015.

SARI, Y.; SEGU, Z. M.; AGHA, A. Y.; KARTY, J. A.; ISAILOVIC, D. Neuroprotective peptide ADNF-9 in fetal brain of C57BL/6 mice exposed prenatally to alcohol. **Journal of Biomedical Science**, [S.I.:s.n.], v. 18, p. 1-12, 2011.

SAVONLAHTI, E.; PAJULO, M.; HELENIUS, H.; KORVENRANTA, H.; PIHA, J. Children younger than 4 years and their substance-dependent mothers in the child welfare clinic. **Acta Paediatrica**, [S.I.:s.n.], v. 93, p. 989-995, 2004.

SCHERFA, K. S.; BEHRMANNC, M.; DAHL, R. E. Facing changes and changing faces in adolescence: A new model for investigating adolescent-specific interactions between pubertal, brain and behavioral development. **Developmental Cognitive Neuroscience**, [S.I.:s.n.], v. 2, n. 2, p. 199-219, 2012.

SEIPP, C. M.; JOHNSTON, C. Mother-son interactions in families of boys with attention deficit/hyperactivity disorder with and without oppositional behavior. **Journal Anormal Child Psychol.**, [S.I.:s.n.], v. 33, p. 87-98, 2005.

SHRESTHA, U.; SINGH, M. Effect of folic acid in prenatal alcohol induced behavioral impairment in Swiss albino mice. **Annals of Neurosciences**, [S.I.:s.n.], v. 20, n. 4 , p. 134-138, 2013.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain research**, [S.I.:s.n.], v. 28, p. 85-95, 1971.

SOOD, B.; DELANEY-BLACK, V.; COVINGTON, C., NORDSTROM-KLEE, B.; AGER, J.; TEMPLIN, T.; JANISSE, J.; MARTIER, S.; . SOKOL, R., J. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years:I. Dose-response effect. **Pediatrics**, Cincinnati, v. 108 (2), p. 1-9, 2001.

SPEAR, L. P.; The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S.I.:s.n.], v. 24, p. 417-463, 2000.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, [S.I.:s.n.], v. 85, p. 367-370, 1985.

STREISSGUTH, A. P.; AASE, J. M.; CLARREN, S. K.; RANDELS, S. P.; LADUE, R. A.; SMITH, D. F. Fetal Alcohol Syndrome in Adolescents and Adults. **JAMA**, [S.I.:s.n.], v. 265 (15), p. 1961, -1967, 1991.

STREISSGUTH, A. P.; BARR, H. M.; SAMPSON, P. D. Moderate prenatal alcohol exposure: effects on child IQ and learning problems at age 7¹/₂ years. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 14, n. 5, 1990.

STREISSGUTH, A.P.; BARR, H.M.; KOGAN, J.; AND BOOKSTEIN, F.L. **Understanding the occurrence of secondary disabilities in clients with fetal alcohol syndrome (FAS) and fetal alcohol effects (FAE)**. In Final Report to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Seattle, Washington: University of Washington, Fetal Alcohol & Drug Unit, 1996.

TERRANOVA, M. L.; LAVIOLA, G. Scoring of social interactions and play in Mice during adolescence. **Current Protocols in Toxicology**, [S.I.:s.n.], v. 13, p. 1-13, 2005.

TERRANOVA, M. L.; LAVIOLA, G.; ALLEVA, E. Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: Gender differences and ongoing isolation outcomes. **Developmental Psychobiology**, [S.I.:s.n.], v. 26, n. 8, p. 467-481, 1993.

THOMAS, J. D.; ABOU, E. J.; DOMINGUEZ, H. D. Prenatal choline supplementation mitigates the adverse effects of prenatal alcohol exposure on development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, Amsterdam, v. 31, p. 303-311, 2009.

THOMAS, S. E.; KELLY, S. J.; MATTSON, S. N.; RILEY, E. P. Comparison of social abilities of children with fetal alcohol syndrome to those of children with similar IQ scores and normal controls. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 22, n. 2, 1998.

TREIT, S.; ZHOU, D.; CHUDLEY, A., E.; ANDREW, G.; RASMUSSEN, C.; NIKKEL, S., M., SAMDUP, D.; HANLON-DEARMAN, A.; LOOCK, C.; BEAULIEU, C. Relationships between head circumference, brain volume and cognition in children with prenatal alcohol exposure. **Plos One**, São Francisco, v.11(2), p. 1-15, 2016.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal Psychosom Research**, [S.I.:s.n.], v. 53, n. 4, p. 865-871, 2002.

TUNC-OZCAN, E.; FERREIRA, A. B.; REDEI, E. E. Modeling fetal alcohol spectrum disorder: validating an ex vivo primary hippocampal cell culture system. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Malden, v. 40, n. 6, 2016.

TUPPER, D. E.; WALLACE, R. B. Utility of the neurological examination in rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, [S.I.:s.n.], v. 40, p. 999-1003, 1980.

VAGLENOVA, J.; PANDIELLA, N.; WIJAYAWARDHANE, N.; VAITHIANATHAN, T.; BIRRU, S.; BREESE, C.; SUPPIRAMANIAM, V.; RANDAL, C. Aniracetam reversed learning and memory deficits following prenatal ethanol exposure by modulating functions of synaptic AMPA receptors. **Neuropsychopharmacology**, [S.I.:s.n.], v. 33, p. 1071-1083, 2008.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; NIESINK, R. J. M.; REE, J. M. V. The neurobiology of social play behavior in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S.I.:s.n.], v. 21, n. 3, p. 309- 326, 1997.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; TREZZA, V. What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, [S.I.:s.n.], v. 16, p. 189-212, 2014.

van KERKHOF, L. W. M.; DAMSTEEGT, R.; TREZZA, V.; VOORN, P.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J. Social Play Behavior in Adolescent Rats is Mediated by Functional Activity in Medial Prefrontal Cortex and Striatum. **Neuropsychopharmacology**. [S.I.:s.n.], V. 38, p. 1899–1909, 2013.

VARLINSKAYA, E. I.; MOONEY, S. M. Acute exposure to ethanol on gestational day 15 affects social motivation of female offspring. **Behavioural Brain Research**, [S.I.:s.n.], v. 261, p. 106–109, 2014.

VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P.; SPEAR, N. E. Social behavior and social motivation in adolescent rats: role of housing conditions and partner's activity. **Physiology & Behavior**, Zurich, v. 67, n. 4, p. 475-482, 1999.

VIEIRA, M. L.; OTTA, E. Efeitos de diferentes períodos de privação social sobre a brincadeira de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). **Biotemas**, v. 10, n. 2, p. 29-46, 1997.

VIEIRA, M. L.; SANTOS, A. H.; SILVA, L.S.; FERNANDES, G. S.A.; KISS, A. C. I.; MOREIRA, E. G.; MESQUITA, S. F. P.; GERARDIN, D. C. C. Lactational exposure to sulpiride: Assessment of maternal care and 2 reproductive and behavioral parameters of male rat pups. **Physiology & Behavior**, Zurich, v. xxx, p. xxx–xxx, 2013.

WALKER, D. S.; EDWARDS, W. E. R.; HERRINGTON, C. Fetal alcohol spectrum disorders: Prevention, identification, and intervention. **The Nurse Practitioner**, [S.I.:s.n.], v. 41 (8), p. 29-34, 2016.

WARD, O. B.; WARD, I. L.; DENNING, HENDRICKS, S. E.; A. FRENCH, J. A. Hormonal mechanisms underlying aberrant sexual differentiation in male rats prenatally exposed to alcohol, stress, or both. **Archives of Sexual Behavior**, [S.I.:s.n.], v. 31, n. 1, p. 9-16, 2002.

WIECZOREK, L.; FISH, E. W.; O'LEARY-MOORE, S. K.; PARNELL, S. E.; SULIK, K. K. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and behavioral dysfunction following early binge-like prenatal alcohol exposure in mice. **Alcohol**, Indianapolis, v. 49, n. 3, p. 207-217, 2015.

WILCOXON, J. S.; KUO, A. G.; DISTERHOFT, J. F.; REDEI, E. E. Behavioral deficits associated with fetal alcohol exposure are reversed by prenatal thyroid hormone treatment: a role for maternal thyroid hormone deficiency in FAE. **Molecular Psychiatry**, [S.I.:s.n.], v. 10, p. 961-971, 2005.

WORKMAN, J. L.; RAINEKI, C.; WEINBERG, J.; GALEA, L. A. M. Alcohol and pregnancy: effects on maternal care, HPA axis function, and hippocampal neurogenesis in adult females. **Psychoneuroendocrinology**, [S.I.:s.n.], v. 57, p. 37-50, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Alcohol (2015). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/> . Acesso em: 25 jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health – 2014 ed. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/> Acesso em: 09 jun. 2016.

YANG, M.; SILVERMAN, J. L.; CRAWLEY, J. N. Automated three-chambered social approach task for mice. **Current Protocols in Neuroscience**, [S.I.:s.n.], v. 8, n. 26, p. 1- 23, 2011.

APÊNDICE

Tabela 07- Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a viabilidade da prole de camundongos fêmeas no DPN2, dados referentes à figura 20.

GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	Padrão	Livre	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Número de filhotes/mãe	10,78±0,46	11,71±1,10	11,05±0,55	8,66±0,59	F _{3, 123} = 4,475
Número de filhotes mortos no DPN2	0,27±0,23	0,14±0,14	0,12±0,06	3,32±0,60*#	F _{3, 82} = 16,21
Peso ninhada padronizada (g)	18,00±0,72	17,43±0,64	15,27±0,55*	11,20±0,64*#	F _{3, 45} = 22,83

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais por experimento: número de filhotes / mãe : padrão (37), *pair feeding* (38), livre (7) e álcool (45); Número de filhotes / mortos DPN2: padrão (26), *pair feeding* (25), livre (7) e álcool (28). Peso em gramas da prole padronizada: padrão (12), *pair feeding* (15), livre (7) e álcool (15). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. O símbolo representa a presença de diferenças estatísticas: * quando comparados ao grupo dieta padrão e # quando comparados ao grupo *pair feeding*.

Tabela 08 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o peso corporal em gramas da prole de ratas (machos e fêmeas), dados referentes às figuras 21 e 22.

GRUPOS EXPERIMENTAIS						
DPN	Padrão		<i>Pair feeding</i>		Álcool	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
2	7,41±0,21	7,07±0,18	6,29±0,31	5,96±0,21	5,84±0,24	5,40±0,17
3	10,58±0,22	10,06±0,25	8,36±0,31	8,24±0,32	8,17±0,26	7,50±0,34
7	17,19±0,44	16,72±0,41	15,80±0,96	15,65±1,15	14,03±0,45	12,97±0,29
10	22,71±0,75	22,66±0,87	21,74±0,63	21,29±1,14	19,41±1,10	18,07±0,96
14	30,79±1,64	30,23±1,19	29,65±0,58	29,28±1,12	25,83±2,13	24,70±1,88
17	36,42±1,96	35,94±1,60	35,41±0,42	34,99±1,26	31,28±2,50	29,26±2,19
21	50,18±2,37	49,45±1,66	46,86±0,39	46,08±1,54	41,36±2,75*#	38,19±1,90*
28	86,31±3,35	81,85±2,50	82,21±1,67	78,42±0,98	73,00±3,60*#	66,51±2,28*#
35	133,49±3,95	123,10±3,44	126,81±2,89	118,47±1,74	114,14±3,78*#	101,62±2,47*#
42	174,94±2,70	151,98±2,74	169,36±2,53	145,48±1,00	153,44±4,11*#	128,43±2,24*#
49	212,83±4,08	174,09±3,56	202,49±2,12*	164,83±2,58*	190,80±5,66*#	148,28±3,68*#

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo padrão (5), *pair feeding* (5) e álcool (5). Os dados são expressos como média ± EPM. Os símbolos representam a presença de diferenças estatísticas: * comparado ao grupo padrão e # comparado ao grupo *pair feeding*.

Tabela 09 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a distância nasoanal em milímetros da prole de ratas, dados referentes à figura 23.

GRUPOS EXPERIMENTAIS						
DPN	Padrão		<i>Pair feeding</i>		Álcool	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
2	54,32±0,55	51,87±0,73	48,48±1,49	48,05±1,26	47,90±1,91	45,98±0,29
7	73,09±0,94	71,63±1,13	69,18±1,66	67,47±1,67	66,01±1,36	64,179±1,19*
14	94,90±1,33	93,89±1,08	87,81±2,13	86,84±3,06*	82,71±1,98	82,43±1,11*
21	117,55±1,90	113,29±1,98	112,43±2,18	111,06±1,37	103,32±4,99	102,42±1,28*#
28	139,77±2,27	134,81±0,85	134,89±2,46	132,79±2,53	127,10±7,23	126,01±1,54*#
35	165,55±3,69	158,04±2,19	158,63±2,55	148,00±4,44*	146,58±10,04*	145,58±2,08*
42	187,61±2,50	172,15±2,20	180,92±3,82	169,10±3,08	164,13±11,67*#	160,06±1,09*#
49	201,43±1,68	-	194,50±3,19	-	175,24±12,35*#	-

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo padrão (5), *pair feeding* (5) e álcool (5). Os dados são expressos como média ± EPM. Os símbolos representam a presença de diferenças estatísticas: * comparado ao grupo padrão e # comparado ao grupo *pair feeding*.

Tabela 10 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o índice anogenital [DAG (mm) / peso(g)] no DPN 21 da prole de ratas, dados referentes à figura 24.

GRUPOS EXPERIMENTAIS						
DPN	Padrão		<i>Pair feeding</i>		Álcool	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
21	0,40±0,01	0,27±0,008	0,41±0,01	0,28±0,01	0,41±0,02	0,29±0,01

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais do grupo dieta padrão (5), *pair feeding* (5) e álcool (5). Os dados são expressos como média ± EPM.

Tabela 11 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento físico da prole de ratas (resultados em dias), dados referentes à figura 25.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	Padrão		Pair feeding		Álcool	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Desdobramento Orelha	1,75±0,20	1,75±0,22	2,81±0,22*	2,43±0,24*	2,85±0,1*	2,73±0,08*
Abertura dos Olhos	13,25±0,34	12,95±0,18	13,45±0,16	13,17±0,14	13,90±0,18	13,70±0,14*#
Erupção do incisivo	10,40±0,12	10,10±0,06	11,48±0,15*	11,15±0,30	11,70±0,48*	11,15±0,39
Descida dos testículos	21,00±0,26	-	21,25±0,43	-	22,15±0,35	-
Abertura Vaginal	-	36,0±1,06	-	36,73±0,83	-	41,02±2,00
Separação prepucial	46,90±0,54	-	46,27±0,78	-	46,90±0,66	-

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais do grupo dieta padrão (5), *pair feeding* (4) e álcool (4). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newnman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. *p < 0,05, **p < 0,01 quando comparado tratamento padrão; # p < 0,05 quando comparado ao tratamento *pair feeding*.

Tabela 12 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o desenvolvimento reflexo da prole de ratas (resultados apresentados em dias), dados referentes à figura 26.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	Padrão		<i>Pair feeding</i>		Álcool	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Endireitar	1,25±0,15	1,45±0,27	1,56±0,20	2,63±0,20*	2,15±0,31*	2,36±0,30*
Geotaxia Negativa	3,60±0,40	3,20±0,41	3,93±0,15	4,14±0,36	4,05±0,33	4,86±0,42*
Apreensão Palmar	8,15±0,28	7,55±0,45	8,70±1,15	9,10±1,00	9,50±0,88	9,78±0,69
Susto auditivo	11,65±0,24	11,55±0,26	12,4±0,18*	12,25±0,19	12,45±0,12*	12,2±0,16
Sensibilidade vibrissas	12,90±0,28	12,45±0,30	12,83±0,25	12,32±0,55	13,10±0,40	13,33±0,28
Acuidade Visual	21,05±0,22	20,80±0,14	21,71±0,58	21,69±0,44	22,60±0,68	22,83±0,82

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo dieta padrão (5), *pair feeding* (4) e álcool (4). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newnman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. *p < 0,05, **p < 0,01 quando comparado tratamento padrão; # p < 0,05 quando comparado ao tratamento *pair feeding*.

Tabela 13 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento não materno dos camundongos fêmeas lactantes (porcentagem de observações do parâmetro em 120 minutos), dados referentes à figura 27.

PARÂMETRO AVALIADO (% de observações em 120 minutos)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Dia/Valor de F
Comportamento não maternal	31,74 ± 7,32	31,11 ± 5,20	20,17 ± 3,15	3° F _{2,27} =1,31
	43,11±7,51	43,83±8,26	34,25±3,41	6° F _{2,28} =0,60
	32,73±4,20	35,33±4,15	34,26±6,11	9° F _{2,27} =0,07
	40,91±5,61	43,75±4,25	43,75±4,25	12° F _{2,28} =0,11

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais dieta padrão (11), *pair feeding* (9) e álcool (10). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 14 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o Comportamento materno dos camundongos fêmeas lactantes (porcentagem de observações do parâmetro em 120 minutos), dados referentes à figura 28.

PARÂMETRO AVALIADO (% de observações em 120 minutos)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	Pair feeding	Álcool	Dia/Valor de F
Agrupando os filhotes	5,22±0,99	4,53±0,89	4,75±1,15	3° F _{2,27} =0,12
	4,39±0,60	3,16±0,88	4,50±0,39	6° F _{2,28} =1,24
	2,72±0,60	2,50±0,48	1,57±0,51	9° F _{2,27} =1,20
	1,13±0,25	1,33±0,31	0,58±0,25	12° F _{2,28} =1,97
Cifose sobre quatro ou mais filhotes	19,33±3,58	29,72±5,29	32,58±5,06	3° F _{2,27} =2,29
	10,42±2,38	21,46±4,42	11,42±1,65	6° F _{2,28} =4,31
	15,23±2,48	20,83±3,87	18,61±2,89	9° F _{2,27} =0,86
	14,92±5,23	13,17±4,04	14,42±2,71	12° F _{2,28} =0,04
Outra posição sobre quatro ou mais filhotes	31,52±4,08	30,28±2,54	37,25±5,29	3° F _{2,27} =0,75
	33,92±6,76	30,42±4,89	43,58±5,44	6° F _{2,28} =1,40
	38,64±4,88	35,50±5,94	35,93±5,82	9° F _{2,27} =0,09
	31,97±4,96	30,67±5,02	37,92±4,49	12° F _{2,28} =0,61
Outra posição sobre três ou menos filhotes	1,97±1,05	0,463±0,46	1,36±0,64	3° F _{2,27} =0,86
	2,33±0,83	2,41±1,35	2,33±1,30	6° F _{2,28} =0,00
	4,01±1,30	3,50±1,50	6,57±2,28	9° F _{2,27} =0,89
	7,80±1,56	8,91±3,52	4,58±1,14	12° F _{2,28} =0,94
Lambendo a região das mamas	4,16±1,38	2,40±1,25	3,66±1,16	3° F _{2,27} =0,48
	3,83±1,09	2,50±0,73	1,50±0,47	6° F _{2,28} =2,09
	2,42±0,63	1,58±0,45	1,66±0,73	9° F _{2,27} =0,60
	1,81±0,51	1,66±0,56	1,75±0,97	12° F _{2,28} =0,01
Lambendo a prole	9,39±2,27	7,87±1,65	8,50±0,91	3° F _{2,27} =0,62
	9,16±2,18	10,67±1,11	6,25±1,35	6° F _{2,27} =2,07
	8,71±1,07	9,50±1,94	6,01±1,08	9° F _{2,27} =1,20
	6,28±1,05	10,33±2,00	6,41±1,14	12° F _{2,28} =1,97
Construindo o ninho	9,58±1,39	5,46±1,41	5,75±2,08	3° F _{2,27} =1,89
	7,58±2,32	3,16±0,90	3,91±1,37	6° F _{2,28} =2,07
	3,41±1,09	3,00±1,19	3,22±2,08	9° F _{2,27} =0,02
	1,21±0,41	1,83±0,70	1,417±0,87	12° F _{2,28} =0,22

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais dieta padrão (11), *pair feeding* (9) e álcool (10). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 15 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento da prole masculina de camundongos durante a adolescência no teste de placa com buracos, dados referentes à figura 29.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Número de mergulhos (número de eventos)	24,49±3,06	27,74±1,70	31,23±4,07	F _{2, 29} = 1,25
Distância percorrida (cm)	1256±102,8	1221±74,12	1242±89,64	F _{2, 29} = 0,04

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais dieta padrão (9), *pair feeding* (12) e álcool (8). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste Newman-Keuls, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 16 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre o comportamento social da brincadeira durante a adolescência da prole masculina de camundongos, dados referentes à figura 30.

	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	Padrão		Pair feeding		Álcool	
	AGRU.	ISO.	AGRU.	ISO.	AGRU.	ISO.
Frequência de <i>push e crawl</i> (número de eventos)	4,0 ±0,62	17,5±1,85	3,88±0,58	16,55±2,13	4,12±0,87	3,33±0,95
Tempo perseguindo (s)	5,17±1,93	48,19±9,14	11,07±3,09	48,82±5,95	8,16±2,30	26,79±7,53
Tempo farejando (s)	62,23±6,20	99,21±3,18	53,23±6,26	93,72±6,30	82,95±3,72	96,66±7,74
Tempo <i>grooming social</i> (s)	3,80±0,90	13,32±4,32	4,92±1,00	8,23±1,86	5,24±0,87	3,78±1,30
Tempo de comportamento não social (s)	238,2±11,05	223,71±10,91	296,6±15,63	259,0±14,95	282,8±14,9	273,1±23,73

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais dieta padrão (16 = 8 isolados e 8 agrupados), *pair feeding* (17 = 9 isolados e 9 agrupados) e álcool (16 = 9 isolados e 8 agrupados). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste Newman-Keuls, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 17 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do comportamento social da brincadeira na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de camundongos (resultados apresentados como número de células positivas para c- fos), dados referentes às figuras 31, 32, 33, 34 e 35.

Região avaliada	GRUPOS EXPERIMENTAIS			Valor de F
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	
Córtex insular agranular	148,4±20,69	154,6±14,13	73,83±21,01*#	F _{2, 17} = 5,46
Córtex piriforme	168,9±12,14	153,2±17,41	59,60±18,9***##	F _{2, 15} = 12,82
Córtex cingulado	122,0±4,91	100,4±12,73	65,17±13,72**#	F _{2, 14} = 7,17
Córtex pré-límbico	286,6±23,78	250,5±29,09	195,5±23,79*	F _{2, 14} = 3,70
Núcleo accumbens shell	142,0±5,43	155,4±11,45	64,25±20,39***###	F _{2, 13} = 15,69
Amígdala lateral	103,6±7,78	110,4±16,51	83,80±13,35	F _{2, 14} = 1,17
Amígdala central	23,43±2,95	30,00±6,02	27,00±7,71	F _{2, 14} = 0,39

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais por grupo (4 - 7). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. Os símbolos representam a presença de diferenças estatísticas: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 quando comparado ao padrão; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 quando comparado ao *pair feeding*.

Tabela 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de campo aberto, dados referentes à figura 36.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS			Valor de F
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	
Cruzamento na periferia (número de eventos)	52,18±5,37	45,92±4,53	41,46±2,92	F _{2, 38} = 1,53
Tempo na periferia (s)	236,8±6,58	239,2±5,74	242,0±3,50	F _{2, 38} = 0,23
Cruzamento no centro (número de eventos)	15,43±2,11	14,78±1,76	13,29±1,31	F _{2, 38} = 0,39
Tempo no centro (s)	63,20±6,58	61,51±5,61	58,01±3,49	F _{2, 38} = 0,24
Cruzamentos totais (número de eventos)	67,61±6,52	60,71±5,66	54,75±3,77	F _{2, 38} = 1,43
Número de rearings (número de eventos)	43,89±5,61	49,01±5,49	38,89±4,58	F _{2, 38} = 1,03

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo álcool (n= 14), *pair feeding* (n= 13) e padrão (n= 14). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância: *p<0,05 quando comparado ao grupo padrão.

Tabela 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de claro-escuro, dados referentes à figura 37.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Tempo no claro (s)	146,1±6,49	146,6±11,74	115,1±13,95	F _{2, 21} = 2,6
Tempo de latência (s)	28,67±5,29	23,68±5,45	16,46±6,19	F _{2, 21} = 1,17
Número de cruzamentos (número de eventos)	20,88±2,06	18,88±2,03	20,29±1,69	F _{2, 21} = 0,28

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo álcool (n= 8), *pair feeding* (n= 8) e padrão (n= 8). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM

Tabela 20 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de nado forçado, dados referentes à figura 38.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Tempo nadando (s)	54,41±11,37	46,72±7,97	59,85±12,35	F _{2, 37} = 0,34
Tempo escalando (s)	15,97±4,02	15,38±3,41	17,21±2,83	F _{2, 37} = 0,06
Tempo flutuando (s)	142,4±9,58	146,6±12,02	125,0±12,06	F _{2, 37} = 1,04

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo álcool (n= 14), *pair feeding* (n= 12) e padrão (n= 14). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 21 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de suspensão pela cauda, dados referentes à figura 39.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Tempo de imobilidade (s)	54,47±5,39	67,63±12,28	112,6±10,43***##	F _{2, 39} = 10,22
Tempo de latência (s)	94,40±8,74	91,12±18,88	42,68±5,04**##	F _{2, 39} = 6,02
Número de eventos imóveis (número de eventos)	13,00±1,64	11,63±2,04	21,14±1,01**##	F _{2, 39} = 9,31

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais grupo álcool (n=15), *pair feeding* (n=14) e padrão (n=15). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. Os símbolos representam o nível de significância: * p < 0,05 quando comparado ao grupo padrão e # p < 0,05 quando comparado ao grupo *pair feeding*.

Tabela 22 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool e do teste de SPC na expressão de células positivas para c-fos no encéfalo de camundongos (resultados apresentados como número de células positivas para c-fos), dados referentes às figuras 40 e 41.

Região avaliada	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Núcleo paraventricular	33,80±9,65	30,67±4,443	74,80±6,82 ^{***}	F _{2,13} = 12,10
Locus coeruleus	19,1,0±3,12	25,0±6,18	47,8±3,87 ^{**##}	F _{2,13} = 11,69
Núcleo septal lateral	184,0±14,34	195,0±22,14	140,3±14,87	F _{2,9} = 2,74
Núcleo do leito da estria terminal	41,50±17,55	38,75±12,03	40,00±23,79	F _{2,9} = 0,69
Núcleo accumbens shell	73,25±12,73	94,75±15,07	85,40±10,63	F _{2,10} = 0,67
Amígdala lateral	32,83±7,56	45,43±8,03	43,25±10,14	F _{2,14} = 0,68
Amígdala central	20,33±5,27	20,00±2,69	17,75±3,19	F _{2,13} = 0,09

Fonte: Da autora.

Nota: Número de animais por grupo (4 - 7). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM. Os símbolos representam a presença de diferenças estatísticas: ^{**}p<0,01 quando comparado ao padrão; ^{##}p<0,01 quando comparado ao *pair feeding*.

Tabela 23 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole masculina de camundongos durante a vida adulta no Teste de enterrar esferas, dados referentes à figura 42.

Parâmetro avaliado	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Número de esferas enterradas	13,34±1,30	11,21±1,75	10,45±2,192	F _{2,38} = 0,79

Fonte: Da autora.

Nota: Grupo álcool (n= 11), *pair feeding* (n= 14) e padrão (n= 16). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 24 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre as respostas comportamentais da prole de camundongos durante a vida adulta no Aparato de três câmaras, dados referentes à figura 43.

GRUPOS EXPERIMENTAIS				
Parâmetro avaliado	Padrão	<i>Pair feeding</i>	Álcool	Valor de F
Tempo na câmara central (s)	100,5±12,96	111,8±9,18	94,95±13,79	F _{2,27} = 0,49
Tempo na câmara social (s)	305,2±25,43	265,2±27,10	306,8±16,81	F _{2,27} = 1,00
Tempo na câmara não social (s)	152,6±14,54	186,0±25,76	157,5±18,23	F _{2,27} = 0,81
Tempo cheirando gaiola com incentivo social (s)	160,2±16,44	149,0±19,66	189,9±12,99	F _{2,27} = 1,62
Tempo cheirando gaiola vazia (s)	51,32±9,29	42,16±5,40	48,66±8,15	F _{2,27} = 0,36
Número de transições entre câmaras (número de eventos)	41,50±3,38	40,40±3,58	36,20±3,33	F _{2,27} = 0,66
Número de <i>self-grooming</i> (número de eventos)	5,67±2,27	3,42±1,38	5,70±2,89	F _{2,27} = 0,33

Fonte: Da autora.

Nota: Teste no aparato de três câmaras realizado durante a vida adulta da prole masculina de camundongos fêmeas expostas no período pré-natal à dieta acrescida de álcool (n= 10), *pair feeding* (n= 10) e padrão (n= 10). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 25 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole masculina de ratas no Teste de motivação sexual durante a vida adulta, dados referentes à figura 44.

GRUPOS EXPERIMENTAIS						
Zona -	Padrão		<i>Pair feeding</i>		Álcool	
	ZIF	ZIM	ZIF	ZIM	ZIF	ZIM
Nº de visitas (número de eventos)	34,33±2,69	31,17±1,99	34,00±3,47	30,71±3,02	30,71±2,39	29,00±1,60
T. de visitas nas zonas (s)	392,0±28,2	245,3±19,44	366,0±27,20	201,90±27,53	291,3±42,07	305,40±42,07
T. de visitas nas zonas/ visitas (s)	11,56±0,75	8,18±1,22	11,42±1,35	6,78±1,00	9,81±1,61	10,82±1,95
Score de preferência ZIF	0,59±0,02	-	0,62±0,03	-	0,48±0,01	-

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

Tabela 26 - Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre a prole feminina no Teste de motivação sexual durante a vida adulta, dados referentes à figura 45.

GRUPOS EXPERIMENTAIS						
Zona	Padrão		<i>Pair feeding</i>		Álcool	
	ZIF	ZIM	ZIF	ZIM	ZIF	ZIM
Nº de visitas (número de eventos)	35,5±2,53	42,8±1,31	28,17±2,02	38,33±3,20	36,5±2,9	40,33±3,45
T. de visitas nas zonas (s)	240,3±10,48	475,5±28,51	236,8±44,85	572,00±35,15	337,2±19,82	357,70±31,79
T. de visitas nas zonas/ visitas (s)	6,87±0,5	11,05±0,41	8,18±1,26	15,24±1,03	9,33±0,31	8,94±0,48
Escore de preferência ZIM	-	0,66±0,02	-	0,68±0,03	-	0,51±0,01

Fonte: Da autora.

Nota: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one way*, seguidos de pós-teste *Newman-Keuls*, com valores expressos como média ± EPM.

ANEXO A- Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – MG.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 13 de maio de 2013.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 509/2013, intitulado “Efeitos da exposição pré-natal ao álcool sobre parâmetros neuroendócrinos e suas influências no comportamento materno, lactação e desenvolvimento físico, reflexo e comportamental de filhotes de ratas wistar” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG

ANEXO B - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – MG.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone (35) 3299-1000 - Fax (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de julho de 2014.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 572/2014, intitulado "Avaliação da exposição pré-natal ao álcool sobre a performance comportamental da prole de camundongos *swiss* durante a vida adulta" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA - Unifal-MG

ANEXO C - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – MG.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de julho de 2014.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 565/2014, intitulado “Avaliação dos diferentes períodos de exposição pré-natal ao Álcool sobre o trabalho de parto, lactação e comportamento materno de camundongos *Swiss*” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG



Effect of prenatal ethanol exposure on sexual motivation in adult rats



Mara Aparecida P. Ávila^a, Gabriela Cristina P. Marthos^b, Liliane Gibram M. Oliveira^b, Eduardo Costa Figueiredo^c, Alexandre Giusti-Paiva^{a,b}, Fabiana Cardoso Vilela^{b,*}

^a Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), Brazil

^b Laboratório de Neuroendocrinologia Comportamental, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas—MG, Alfenas, Brazil

^c Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas—MG, Alfenas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2016

Received in revised form

12 May 2016

Accepted 12 May 2016

Keywords:

Alcohol

Offspring

Sexual behavior

Sexual motivation test

ABSTRACT

Maternal alcohol use during pregnancy adversely affects prenatal and postnatal growth and increases the risk of behavioral deficits. The aim of the present study was to evaluate the effect of prenatal exposure to a moderate dose of alcohol on sexual motivation during adulthood. Rats were prenatally exposed to ethanol by feeding pregnant dams a liquid diet containing 25% ethanol-derived calories on days 6 through 19 of gestation. The controls consisted of pair-fed dams (receiving an isocaloric liquid diet containing 0% ethanol-derived calories) and dams with *ad libitum* access to a liquid control diet. The sexual motivation of offspring was evaluated during adulthood. The results revealed that the male and female pups of dams treated with alcohol exhibited reduced weight gain, which persisted until adulthood. Both male and female adult animals from dams that were exposed to alcohol showed a reduction in the preference score in the sexual motivation test. Taken together, these results provide evidence of the damaging effects of prenatal alcohol exposure on sexual motivation responses in adulthood.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

During fetal development, the organism must work inside a delicate balance that depends on the uterine environment within which it grows and the placental connection between itself and the mother from whom it receives oxygen and nutrients. This balance can be directly affected by the substances that the mother ingests (Behnke & Smith, 2013; Streissguth & LaDue, 1987; Warren, 2015). In this context, harmful use of alcohol causes approximately 5.1% of the global burden of diseases such as fetal alcohol spectrum disorder that are attributable to alcohol use by women during their pregnancies (World Health Organization, 2014).

Studies have shown that alcohol consumption during pregnancy can be detrimental to the development of the fetus as well as to the continued growth and development of the child after birth and during adulthood (Mattson & Riley, 1998; Mattson, Crocker, & Nguyen, 2011). In addition to these alterations, prenatal alcohol exposure can produce a variety of altered behaviors during

adulthood, such as interruption of maternal behavior (Pepino, Abate, Spear, & Molina, 2002), reduction of aggressive behavior probably related to lower testosterone levels (Lugo, Marino, Gass, Wilson, & Kelly, 2006), and feminized behavior in males and masculinized behaviors in females during the play behavior test (Meyer & Riley, 1986). Moreover, male rats prenatally exposed to alcohol show impaired masculinization and defeminization of sexually dimorphic copulatory behavior, characterized by female-typical lordosis behavior and failure to ejaculate (Ward, Ward, Winn, & Bielawski, 1994). Although there are data about the influence of prenatal alcohol exposure on behavioral changes and impaired reproductive function in adulthood, little is known about the effects of prenatal alcohol exposure on the potential changes in sexual behavior. Thus, the aim of this study was to evaluate whether sexual motivation of adult rats is affected by moderate prenatal exposure to alcohol.

Materials and methods

Animals

Adult virgin female (230–250 g) and male (280–300 g) *Wistar* rats were obtained from the Central Animal Facility of the Federal

* Corresponding author. Laboratório de Neuroendocrinologia Comportamental, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Av. Jovino Fernandes Sales, 2600 Prédio E Sala 300 Santa Clara, Alfenas 37130-000, MG, Brazil. Tel.: +55 35 3701 1890; fax: +55 3299 1117.

E-mail address: facvilela@gmail.com (F.C. Vilela).

University of Alfenas. The animals were housed in a temperature- (22 °C) and humidity-controlled (40–60%) room on an automatic 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). After 10 days of acclimation, the nulliparous females were mated by placing them with sexually experienced males. The onset of pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa in vaginal smears collected the next morning, which was designated as gestation day 0 (GD0). Pregnant females were then weighed and individually housed in standard plastic breeding cages (42 × 34 × 16 cm). All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas (509/2013).

Maternal alcohol exposure

Pregnant rats at GD6 were randomly assigned to one of three treatment groups, based on liquid diet. (1) Alcohol group – these animals were given free access to a liquid diet containing 25% alcohol-derived calories; (2) pair-fed group – animals were offered a liquid control diet with sucrose isocalorically replaced for ethanol, in an amount matched to that consumed by an ethanol-fed partner (g/kg body weight/day of gestation); and (3) *ad libitum*-fed control group – animals were offered *ad libitum* access to a liquid control diet. The liquid diet consisted of chocolate-flavored Sustagen 0.2 g/mL (Mead Johnson; Brazil) supplemented with 0.05 g/mL vitamins for rodents (Roovit; Brazil) in water.

The volume of diet that was consumed was measured daily. All animals received fresh diet daily within 1 h prior to lights-off to prevent a shift of corticosterone circadian rhythms, which occurs in animals that are on a restricted feeding schedule, such as pair-fed animals.

The liquid diets were discontinued after GD19 to decrease the risk of cannibalism by the dams at birth (McMurray et al., 2008). On GD19, the liquid diets were replaced by continuous access to lab chow and the breeding cages were checked daily for births. The animals were allowed free access to water during all experimental periods. The day of parturition (PND0) was recorded for each litter. To reduce variation in the growth of the pups, the litters were culled to 8 pups (4 males and 4 females) on PND1. The culled pups were visually examined for abnormalities, and then euthanized by inhalation of the anesthetic halothane.

Blood alcohol concentration

In order to determinate the maximal or near maximal blood alcohol concentration achieved by alcohol-consuming rats, blood samples were taken on GD19 by decapitation ($n = 7$ dams/group), 2 h after lights-off, which typically follows a major eating bout. The ethanol was quantified in total blood samples by using a gas chromatograph (model GC1000, Ciola & Gregori, S. Paulo, SP, Brazil), equipped with a flame ionization detector and a capillary column HP Innowax (length 30 m, internal diameter 0.53 mm, film thickness 1.0 μm). The operational conditions were injector temperature: 150 °C, detector temperature: 180 °C, column temperature: 120 °C. The carrier gas was nitrogen (flow rate of 8.0 mL/min). Hydrogen, synthetic air, and nitrogen were used in the detector at 0.80, 0.95 and 0.70 bar, respectively. The standard calibration curve was calculated by using a rat blank blood sample fortified with ethanol from 0.2 to 4.0 g/L, using butanol at 1.0 g/L as internal standard. For each analysis, 0.5 mL of each analytical standard and 0.5 mL of the butanol solution were added into a 5 mL glass flask, which was sealed and put into an oven at 80 °C for 10 min. Afterward, 0.1 mL of the headspace was injected into the chromatograph for the analysis. The rat samples were submitted to the same analytical procedure.

Physical development

One male and one female from each litter (control, $n = 10$; pair-fed, $n = 8$; and alcohol, $n = 10$ litters) were weighed at PND1, PND3, PND7, PND10, PND14, PND21, PND28, PND35, PND42, and PND49. The testicular descent (descent of both testes to the scrotum) and vaginal opening were assessed in one male and one female from each litter. A digital pachymeter was used to measure the anogenital distance (considered as the length from the anus to the genital tubercle) in millimeters, and the anogenital index was calculated as the ratio of the anogenital distance/body weight. One male and one female pup from each litter were marked with ink and used for all physical development assessments as well as for body weight follow-ups. On PND21, the offspring were weaned and the littermates were housed together, but separated according to sex (Smart & Dobbing, 1971). One male and one female pup from each litter were used for offspring evaluations to minimize potential confounding factors associated with the litter (Lazic & Essioux, 2013).

Sexual incentive motivation test

The sexual behavior of male and female adults was evaluated at 70 days of age. The experiments were adapted from methodology proposed by Ágmo (Ágmo, 1997; Ágmo, 2003). Sexual incentive motivation was evaluated in an oval open field (100 × 50 cm) surrounded by a 45 cm high wall. An incandescent light bulb provided dim red light (approximately 5 lux in the arena). The incentive animals (a receptive female for sexual incentive for males or social incentive for females, and a sexually experienced male for social incentive for males or sexual incentive for females) were located in cages placed outside the arena at diagonally opposed corners on each long wall. The incentive females (receptive) were ovariectomized under anesthesia about 2 weeks before the start of experiments. Sexual receptivity was induced by subcutaneous (s.c.) injection of 25 μg of estradiol benzoate about 52 h before tests and progesterone (1 mg, s.c.) injected about 4 h before tests. Both steroids were from Sigma (St. Louis, MO, USA) and they were dissolved in peanut oil and injected in a volume of 0.2 mL/rat. An opening (25 × 25 cm), located at floor level, in the arena wall allowed the test animals to communicate with each incentive animal cage, as previously described (Ágmo, 2003). A wire mesh separated the incentive animal from the experimental subject. A zone (20 × 30 cm) outside each incentive animal cage was designated the incentive zone (Fig. 1, Supplementary Video 1). To start the experiment, the subjects were habituated to the testing environment during three 10 min sessions. The incentive animals were not present during the habituation procedure. Immediately before each session, the arena and the incentive animal cages were cleaned with a solution of ethanol in water. The test was similar to the habituation procedure and lasted for 20 min, but in this case, an incentive rat was placed in each incentive animal cage. During the test, the subject could hear, see, and smell the incentive animals but no copulatory interactions were possible. The vaginal secretions of female rats' offspring of control, pair-fed, or alcohol-fed dams were collected every day (4:00 PM) and examined microscopically using a light microscope. The characteristics of the four phases (proestrus, estrus, metestrus, and diestrus) of the estrous cycle were determined by the proportion of the epithelial cells, cornified cells, and leukocytes in the vaginal smear. A female rat in proestrus phase was marked and selected for the sexual motivation test at 8:00 PM of the same day. We registered the number of visits and time that the experimental rats spent in the female incentive zone (FIZ) or male incentive zone (MIZ). In addition, a preference score (time spent in the female or male zone/time spent in both incentive zones) was

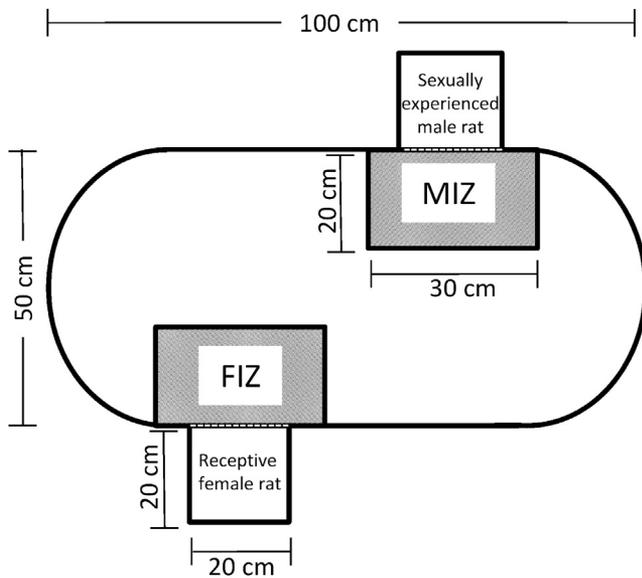


Fig. 1. A modified apparatus of Ágmo used in the sexual motivation test.

calculated (Ágmo, 1997, 2003). The videotape analyses were conducted with the evaluator blind to the experimental condition.

Statistical analysis

The data were analyzed using the GraphPad software program Version 6.0 and expressed as the means \pm standard error of mean (S.E.M.). The statistically significant differences between groups were calculated using an analysis of variance (ANOVA), with repeated measures where appropriate, followed by the Newman–Keuls test. p values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered significant.

Results

Total caloric intake of the alcohol- and pair-fed groups was about 86.2% of the intake from *ad libitum* controls. This was reflected in the significantly lower maternal body weights during gestation of the alcohol- and pair-fed groups compared to the *ad libitum* controls (factor diet: $F[2,115] = 8.43$, $p < 0.001$; factor days of gestation: $F[6,115] = 124.1$, $p < 0.001$; interaction diet \times days of gestation: $F[12,115] = 0.92$, $p = 0.52$; Fig. 2). The average consumption of ethanol by the alcohol group was 3.84 mL/day resulting in mean plasma alcohol levels of 43.6 ± 7.4 mg/100 mL on GD19 of pregnancy.

The birth weights of the male (Fig. 3A; $F[2,25] = 10.9$; $p < 0.001$) and female (Fig. 3E; $F[2,25] = 16.3$; $p < 0.001$) offspring from both the alcohol- and pair-fed dams were significantly reduced compared to the offspring from the control dams. In addition, the offspring from the alcohol-fed dams maintained a lower weight until PND49 compared to the control group (male: $F[2,25] = 6.93$; $p < 0.01$ and female: $F[2,25] = 10.3$; $p < 0.001$). However, the pups from the pair-fed dams recovered a normal weight after PND21 (males, Fig. 3B) or PND7 (females, Fig. 3F). At PND49, there were no changes in the anogenital index of the males or females from any of the groups (Fig. 3C and G, male and female offspring, respectively). In addition, there were no observed changes in the animals' sex-specific physical development, such as testes descent (Fig. 3D), separation of the prepuce (data not shown), and vaginal opening (Fig. 3H).

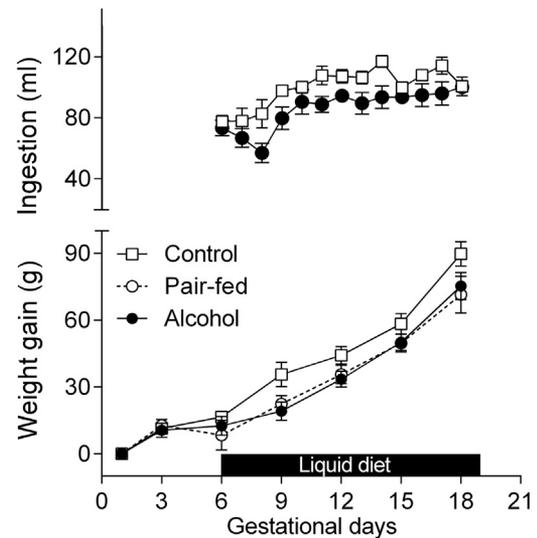


Fig. 2. Consumption of liquid diet (above) and weight gain (below) from gestational days 6–19 by pregnant rats. The data are presented as the means \pm S.E.M. $n = 10$ animals/group.

Fig. 3 shows that although no change occurred in the number of visits of animals to MIZ and FIZ (Fig. 4A), male offspring from the control or pair-fed dams spent more time in the FIZ than in the MIZ (Fig. 4B) and visited the FIZ more often than the MIZ (Fig. 4C). Moreover, the male offspring from the alcohol dams showed reduction in score preference for the FIZ when compared to control and pair-fed groups (Fig. 4D; $F[2,17] = 10.6$; $p < 0.05$). In addition, the female visited the MIZ more often than FIZ (Fig. 4E, $p < 0.05$), and only the female offspring from control or pair-fed dams visited (Fig. 4F, $p < 0.05$) and spent more time in the MIZ (Fig. 4G, $p < 0.05$). Female offspring from the alcohol-fed dams spent less time in the MIZ (Fig. 4F; $F[2,17] = 11.6$; $p < 0.05$), visited the MIZ less often (Fig. 4G; $F[2,17] = 20.4$; $p < 0.05$), and exhibited a reduced score preference for the MIZ (Fig. 4H; $F[2,17] = 20.4$; $p < 0.05$).

Discussion

This study demonstrated that male and female pups that were prenatally exposed to alcohol exhibited a reduced sexual motivation in adulthood. Postnatal growth restriction is frequently observed in models of high-dose prenatal alcohol exposure (Gottesfeld & Silverman, 1990; Sigh & Snyder, 1982; Thomas, Abou, & Dominguez, 2009). Our findings show that offspring of pregnant rats who ingested alcohol exhibited low birth weights, and weights remained smaller throughout the experiment. Abel and Dintcheff (Abel & Dintcheff, 1978) and Probyn and colleagues (Probyn, Zanini, Ward, Bertram, & Moritz, 2012) also showed that alcohol-exposed offspring demonstrate reduced weight gain compared to controls, suggesting that chronic prenatal alcohol exposure may retard the growth of the pups during development and in adulthood. In addition, Detering and colleagues (Detering, Reed, Ozand, & Karahasan, 1979) suggested that the fetal body weights were reduced by maternal alcohol consumption and were confounded by maternal undernutrition, as demonstrated by the use of pair-fed groups (Detering et al., 1979). In fact, the pups of the pair-fed dams exhibited low birth weights that recovered to the level of the pups from the dams that were fed a control diet *ad libitum*. Moreover, studies have also shown that prenatal alcohol exposure can reduce the postnatal plasma concentrations of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), a growth promoting peptide. The IGF-1

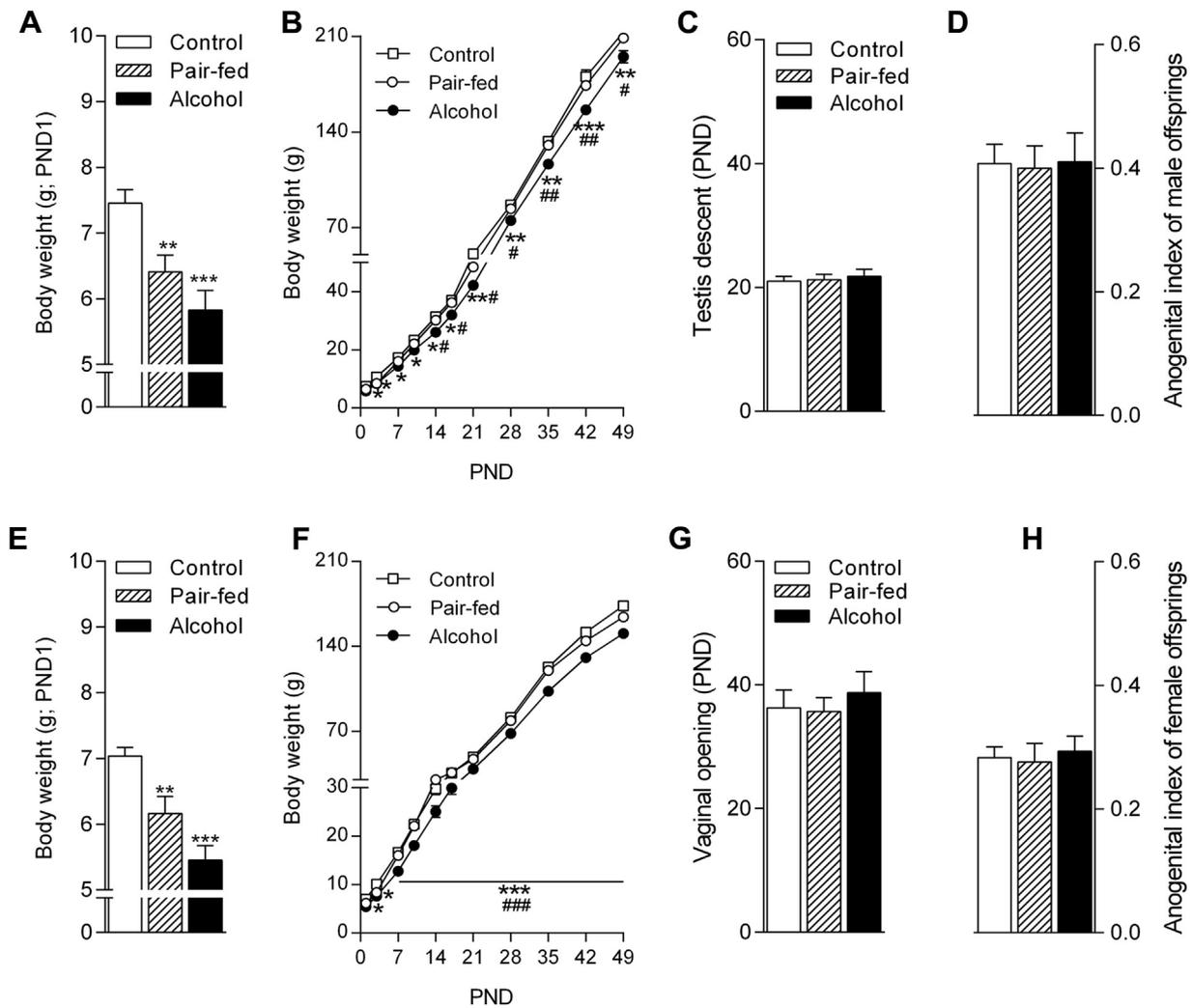


Fig. 3. Effect of maternal alcohol exposure from gestational days 6–19 on the pups' body weights at PND1, body weight gain from PND1–49, anogenital index at PND21, and physical development (testes descent or vaginal opening) of the male (above, A, B, C, and D) and female (below, E, F, G, and H) offspring. Groups: one male and one female from each litter (control, $n = 10$; pair-fed, $n = 8$; and alcohol-fed, $n = 10$ litters). The data are presented as the means \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to the control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared to the pair-fed group.

levels are also correlated with the somatic and brain growth deficits in these offspring (Breese, D'Costa, Ingram, Lenham, & Sonntag, 1993), providing biochemical evidence for alcohol-induced alterations that are related to somatic growth development.

The deleterious actions of prenatal alcohol exposure on reproductive function have been observed in adulthood (Hård et al., 1984; Ward et al., 1994). The novel finding of this study was that prenatal ethanol exposure reduced the preference score of the male and female rats in the sexual incentive test. In this test, the subjects can see, hear, and smell the stimulus animals (the incentives), but do not have physical contact with them because the stimulus animals are confined behind a wire mesh. Approach behavior in males and females is induced by a social or sexual stimulus; the subjects' repeated approach to the stimulus animals likely indicates an associated positive affective state.

Sexual motivation and copulatory performance (of males) or receptive behavior (of females) are the two main components of sexual behavior. Sexual motivation is comprised of all of the anticipatory actions that lead up to sexual activity, such as the search for and approach to potential mates. An adult individual with functionally active gonads is not constantly sexually aroused

or motivated (arousal and motivation are frequently used interchangeably; Ágmo, 1997). Sexual motivation is activated when a suitable stimulus, e.g., a mate, is perceived. The suitable stimulus is supposed to activate the approach behavior, namely, it may function as an incentive. Thus, sexual motivation could be regarded as incentive motivation. For this, the stimuli with sexual meaning must be able to activate the approach behavior. Our study shows that the male and female offspring from the alcohol-fed dams exhibited reduced sexual motivation. These alterations can be related to the sexual attractiveness patterns of the sex partner and the individual's ability to recognize these patterns through the somatosensory system. In rodents, sex-partner preference is mediated in part through the effects of odors acting through the vomeronasal organ (Bakker, Van Ophemert, & Slob, 1996), and studies have shown that maternal ethanol intake affects olfactory function (Gass, Jenkins, Marino, Lugo, & Kelly, 2007) and causes changes in the somatosensory cortex (Margret et al., 2005).

In addition, one possible interpretation may be that there are alterations in the nucleus accumbens, which is considered a critical area for the motivational aspects of sexual behavior in females (Jenkins & Becker, 2001). Another study showed that prenatal

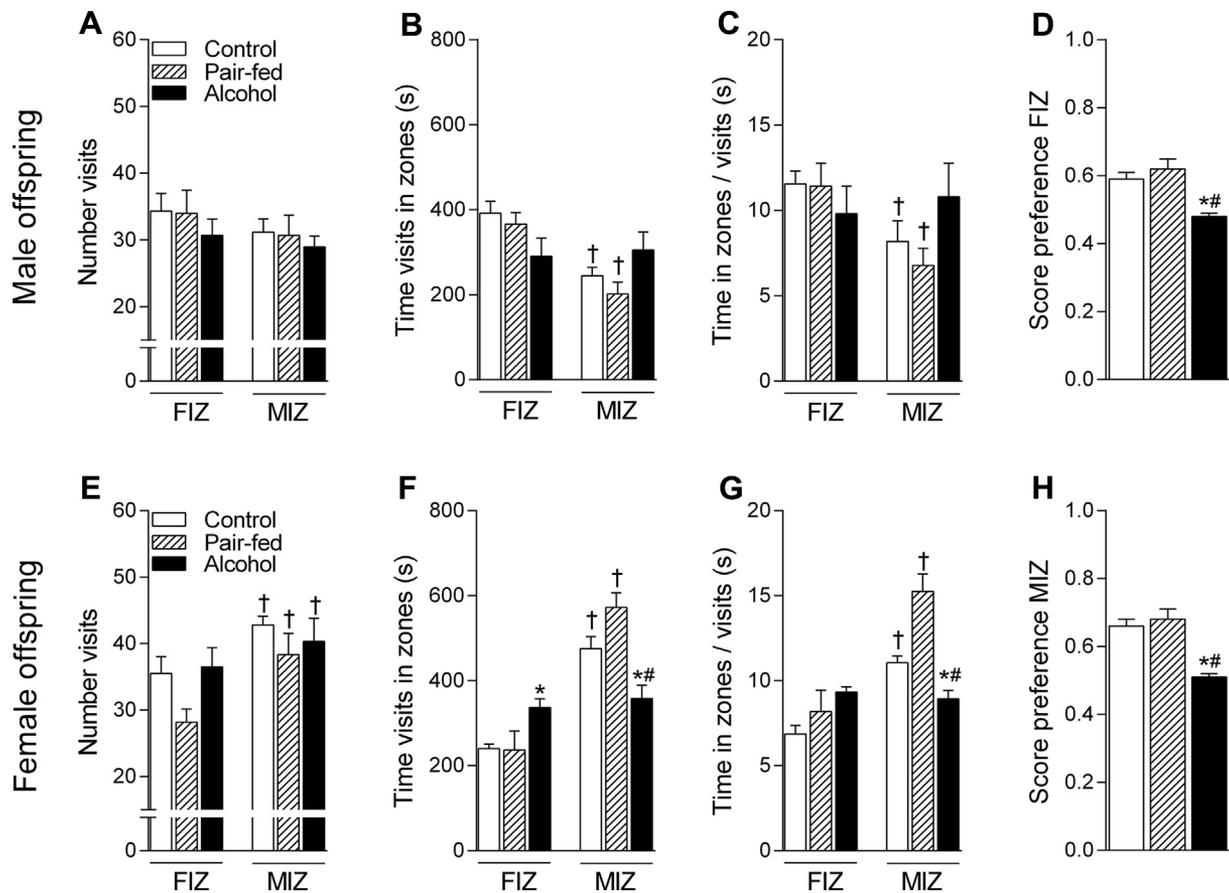


Fig. 4. Effect of maternal alcohol exposure from gestational days 6–19 on the sexual incentive test in the adult male (above, A, B, C, and D) and female (below, E, F, G, and H) offspring (PND70). MIZ: male incentive zone; FIZ: female incentive zone. Groups: one male and one female from each litter (control, $n = 6$; pair-fed, $n = 8$; and alcohol-fed, $n = 8$ litters). The data are presented as the means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ compared to the control group; # $p < 0.05$ compared to the pair-fed group. † $p < 0.05$ in relation to the respective group in the MIZ.

exposure to moderate levels of ethanol is associated with a robust reduction in the dendritic branching and length of medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell (Rice et al., 2012).

In addition to changes in the critical area for the motivational aspects of sexual behavior, the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and its hormones play an essential role for pubertal development and sexual behavior. A disruption of this axis may cause a delayed onset of puberty and alterations in gonadotropin-releasing hormone neuronal morphology in female rats exposed prenatally to ethanol (McGivern & Yellon, 1992). Furthermore, alterations in the circulating levels of testosterone during and/or after intrauterine development may be related to atypical sexual behaviors in rats that were prenatally exposed to alcohol. Previous studies show that prenatal alcohol exposure can alter the plasma concentrations of testosterone in male offspring (McGivern, Handa, & Redei, 1993; Ward et al., 2003), which allows us to suggest a possible role for this hormone in the behavioral impairments presented in this study.

The results presented here demonstrate that prenatal exposure to ethanol showed a reduction in sexual motivation in both males and females, suggesting that prenatal exposure to even moderate doses of alcohol can negatively affect the sexual behavior of the adult offspring.

Acknowledgments

We are grateful for the excellent technical support of José dos Reis Pereira. This work was supported by Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, #456078/2014-2; FCV and #300977/2013-1; AG-P), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG #01483/2013, AG-P).

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.05.002>.

References

- Abel, E. L., & Dintcheff, B. A. (1978). Effects of prenatal alcohol exposure on growth and development in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 207, 916–921.
- Bakker, J., Van Ophemert, J., & Slob, A. K. (1996). Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiology & Behavior*, 60, 489–494.
- Behnke, M., & Smith, V. C. (2013). Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics*, 131, e1009–e1024.
- Breese, C. R., D'Costa, A., Ingram, R. L., Lenham, J., & Sonntag, W. E. (1993). Long-term suppression of insulin-like growth factor-1 in rats after *in utero* ethanol exposure: relationship to somatic growth. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264, 448–456.
- Detering, N., Reed, W. D., Ozand, P. T., & Karahasan, A. (1979). The effects of maternal ethanol consumption in the rat on the development of their offspring. *The Journal of Nutrition*, 109, 999–1009.
- Gass, J. T., Jenkins, W. J., Marino, M. D., Lugo, J. N., Jr., & Kelly, S. J. (2007). Alcohol exposure during development: analysis of effects on female sexual behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 31, 2065–2072.
- Gottesfeld, Z., & Silverman, P. B. (1990). Developmental delays associated with prenatal alcohol exposure are reversed by thyroid hormone treatment. *Neuroscience Letters*, 109, 42–47.

- Hård, E., Dahlgren, I. L., Engel, J., Larsson, K., Liljequist, S., Lindh, A. S., et al. (1984). Development of sexual behavior in prenatally ethanol-exposed rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 14, 51–61.
- Jenkins, W. J., & Becker, J. B. (2001). Role of the striatum and nucleus accumbens in paced copulatory behavior in the female rat. *Behavioural Brain Research*, 121, 119–128.
- Lazic, S. E., & Essioux, L. (2013). Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neuroscience*, 14, 37.
- Lugo, J. N., Jr., Marino, M. D., Gass, J. T., Wilson, M. A., & Kelly, S. J. (2006). Ethanol exposure during development reduces resident aggression and testosterone in rats. *Physiology & Behavior*, 87, 330–337.
- Margret, C. P., Li, C. X., Elberger, A. J., Matta, S. G., Chappell, T. D., & Waters, R. S. (2005). Prenatal alcohol exposure alters the size, but not the pattern, of the whisker representation in neonatal rat barrel cortex. *Experimental Brain Research*, 165, 167–178.
- Mattson, S. N., Crocker, N., & Nguyen, T. T. (2011). Fetal alcohol spectrum disorders: neuropsychological and behavioral features. *Neuropsychology Review*, 21, 81–101.
- Mattson, S. N., & Riley, E. P. (1998). A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 279–294.
- McGivern, R. F., Handa, R. J., & Redei, E. (1993). Decreased postnatal testosterone surge in male rats exposed to ethanol during the last week of gestation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 17, 1215–1222.
- McGivern, R. F., & Yellon, S. M. (1992). Delayed onset of puberty and subtle alterations in GnRH neuronal morphology in female rats exposed prenatally to ethanol. *Alcohol*, 9, 335–340.
- McMurray, M. S., Williams, S. K., Jarrett, T. M., Cox, E. T., Fay, E. E., Overstreet, D. H., et al. (2008). Gestational ethanol and nicotine exposure: effects on maternal behavior, oxytocin, and offspring ethanol intake in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 30, 475–486.
- Meyer, L. S., & Riley, E. P. (1986). Social play in juvenile rats prenatally exposed to alcohol. *Teratology*, 34, 1–7.
- Pepino, M. Y., Abate, P., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2002). Disruption of maternal behavior by alcohol intoxication in the lactating rat: a behavioral and metabolic analysis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26, 1205–1214.
- Probyn, M. E., Zanini, S., Ward, L. C., Bertram, J. F., & Moritz, K. M. (2012). A rodent model of low- to moderate-dose ethanol consumption during pregnancy: patterns of ethanol consumption and effects on fetal and offspring growth. *Reproduction, Fertility, and Development*, 24, 859–870.
- Rice, J. P., Suggs, L. E., Lusk, A. V., Parker, M. O., Candelaria-Cook, F. T., Akers, K. G., et al. (2012). Effects of exposure to moderate levels of ethanol during prenatal brain development on dendritic length, branching, and spine density in the nucleus accumbens and dorsal striatum of adult rats. *Alcohol*, 46, 577–584.
- Sigh, S. P., & Snyder, A. K. (1982). Ethanol ingestion during pregnancy: effects on pregnant rats and their offspring. *The Journal of Nutrition*, 112, 98–103.
- Smart, J. L., & Dobbins, J. (1971). Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Research*, 28, 85–95.
- Streissguth, A. P., & LaDue, R. A. (1987). Fetal alcohol. Teratogenic causes of developmental disabilities. *Monographs of the American Association of Mental Deficiency*, 8, 1–32.
- Thomas, J. D., Abou, E. J., & Dominguez, H. D. (2009). Prenatal choline supplementation mitigates the adverse effects of prenatal alcohol exposure on development in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 31, 303–311.
- Ward, I. L., Ward, O. B., Affuso, J. D., Long, W. D., 3rd, French, J. A., & Hendricks, S. E. (2003). Fetal testosterone surge: specific modulations induced in male rats by maternal stress and/or alcohol consumption. *Hormones and Behavior*, 43, 531–539.
- Ward, I. L., Ward, O. B., Winn, R. J., & Bielawski, D. (1994). Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors. *Behavioral Neuroscience*, 108, 1188–1195.
- Warren, K. R. (2015). A review of the history of attitudes toward drinking in pregnancy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39, 1110–1117.
- World Health Organization. (2014). Global status report on alcohol and health – 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. In *Global status report on alcohol and health – 2014* Geneva, Switzerland: Publications of the World Health Organization, WHO Press, World Health Organization.
- Ágmo, A. (1997). Male rat sexual behavior. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 1, 203–209.
- Ágmo, A. (2003). Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 117, 3–14.