

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

NEUROCIÊNCIAS

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ASTROGLIAIS EM RATOS
ADOLESCENTES EXPOSTOS AO ÁLCOOL NO PERÍODO PRÉ-NATAL

Giovana Brolese

Orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

AValiação de parâmetros astrogliais em ratos adolescentes
expostos ao álcool no período pré-natal

Giovana Brolese

Orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Porto Alegre

2014

“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço”.

(Dave Weinbaum)

AGRADECIMENTOS

Acredito que a vida sempre nos coloca perto e/ou em contato de pessoas com quem temos afinidade ou com quem precisamos aprender a crescer como profissionais e como seres humanos. Todas as pessoas que citarei aqui certamente me ajudaram e me ensinaram a crescer.

Agradeço ao meu orientador, CA, pela confiança, pelo carinho e principalmente pela segurança que sempre me passou desde que eu entrei no lab, na iniciação científica. Com o CA a gente aprende a levar a vida um pouco mais leve e pensar que tudo vai dar certo, mas com muita responsabilidade. Será para sempre o meu “chefe”... aquele que tá sempre com a porta do gabinete aberta e que por mais atucanado que esteja, sempre tem uns minutinhos para eu desabafar e contar a minha aflição... Chefe que conta piadas, que faz happy hour, que coordena a mulherada do Lab33, que sempre pensa no lado positivo de qualquer situação, mas que come a gordura da picanha, hehehehe. Esse chefe vale ouro!!

A Marina, para mim “Marineide”, que me apresentou a pesquisa, com todo seu entusiasmo e amor, me ensinou desde como se pegava uma pipeta até como fazer e apresentar um pôster. Foi, além de mestre, uma grande amiga que levarei para sempre.

A Pati Nardim e a Dani pela doçura, pela paciência, pelos ensinamentos, por me salvarem em horas de apuros e principalmente pela amizade!!

A Paulinha que morou comigo no lab por mais de três meses, que estudou comigo, que pensou e planejou esse doutorado comigo... Meu débito a ti é infinito. Obrigada por toda ajuda e pela amizade sincera e colaborativa que temos.

A Núbia, amiga surpresa que ganhei nesse doutorado. Obrigada pelo trabalho, paciência, palavras meigas e carinho dedicado, inclusive finais de semana e madrugadas fazendo experimento... Sei que para ti o experimento não era meu, era nosso!! Torço por ti como se fosse uma irmã!

A Fran, minha primeira e única bolsista, nos tornamos amigas e fizemos da pesquisa o nosso elo de amizade. Agradeço tua dedicação no meu trabalho,

dando cerveja para os ratos, inclusive finais de semana... Levarei para sempre o teu carinho comigo, torço muito pelo teu sucesso!

A Cris, pessoa mais gentil, simpática e querida que já conheci, obrigada pela tua colaboração e pelas tuas palavras sempre cheias de alegria e de carinho.

A Beta, pelo suporte por trás das câmeras, minha dinda, minha amiga, minha colega!! Sabes que sempre segui os teus passos... hehehehe!

Agradeço a todos os integrantes desse lab33 que tanto adoro, que me ensinaram e me ajudaram a aprender a trabalhar em equipe e evoluir como pessoa.

Agradecimento especial a minha amigona do peito, Fernanda Lopes, que além de amiga, confidente, colega e parceira de festa e de trabalho desde o mestrado, leu e corrigiu meus artigos e esta tese. Nossa amizade que começou num congresso cresce a cada dia mais! Agradeço pela atenção, pelas palavras, pelo carinho, pelas caminhadas e pelos ensinamentos científicos e pessoais. Tenho certeza que a nossa amizade vai além desta vida!

Ao amor, compreensão e incentivo que recebo todos os dias da minha família. Minha irmã Grazi, meu pai e minha mãe por toda a força, apoio e carinho que recebo de vocês. Sinto sempre perto de mim o orgulho, a confiança e o amor que depositam em mim. Esse amor é incondicional e eterno. Amo muito vocês três!

Ao Tiago, meu marido, amigo e amante. Tu és meu anjo desde que éramos criancinhas, e hoje mais do que anjo, és meu porto seguro. Meu controle emocional e meu sucesso profissional não seriam o mesmo se não fosse por ti.

Obrigada sempre pelo carinho, paciência e dedicação. Te amo para sempre!

Agradeço também a todas as pessoas que passaram pela minha vida nesta fase do doutorado e contribuíram com boas conversas, desabafos, carinhos, boas energias, cafés, jantas e happy hours.

Agradeço ainda à UFRGS e ao PPG Neurociências pela estrutura e oportunidade e também ao CNPq pelo apoio financeiro para realização do meu doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
APRESENTAÇÃO	8
PARTE I	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁLCOOL	12
1.2 MODELO ANIMAL DE EXPOSIÇÃO AO ETANOL	15
1.3 ETANOL E A GLIA	16
1.3.1 Astrócitos	18
1.3.2 Proteína S100B	20
1.3.3 Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)	22
1.3.4 Sistema glutamatérgico	23
1.4 COMPORTAMENTO E EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ETANOL	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
PARTE II	32
ARTIGO 1	33
ARTIGO 2	44
PARTE III	74
3 DISCUSSÃO	75
4 LIMITAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
5 CONCLUSÕES	90
6 PERSPECTIVAS	92
7 REFERÊNCIA	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ILUSTRAÇÃO DE UMA SINAPSE TRIPARTITE.....	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA	Análise de variância
CAS	Concentração de álcool no sangue
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FASD	Doenças fetais do espectro do álcool
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GLAST	Transportador aspartato glutamato
GLT-1	Transportador glial de glutamato 1
GSH	Glutathiona reduzida
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
LCR	Líquido cefaloraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MPAE	Exposição pré-natal moderada ao álcool
NMDA	N-metil-d-aspartato
ON	Óxido nítrico
OPD	o-phenylenediamina
PMDAT	Tarefa discriminativa passiva com o labirinto em cruz
QI	Coeficiente de inteligência
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
SAF	Síndrome alcoólica fetal
SNC	Sistema nervoso central
TDAH	Transtordo de déficit de atenção e hiperatividade

APRESENTAÇÃO

A presente seção tem como objetivo apresentar o tema central e os capítulos que compõem essa tese, com o intuito de facilitar a leitura e compreensão por parte da banca examinadora e daqueles que se interessarem por este trabalho.

A tese trata dos efeitos da administração pré-natal ao álcool e a importância da avaliação de parâmetros gliais envolvidos durante o desenvolvimento. Devido a complexidade dos efeitos fetais que podem ser ocasionados por diferentes doses de álcool, compreender melhor os mecanismos e alvos moleculares envolvidos são de interesse médico, econômico e social. Assim, a investigação da participação de células gliais nesses efeitos fazem parte da descoberta de novas estratégias de tratamento.

Esta tese encontra-se dividida em três partes. A parte I refere-se à introdução do trabalho dando ênfase nos efeitos do etanol quando administrado durante o período gestacional, buscando mostrar a importância de estudar parâmetros gliais que possam estar envolvidos nos prejuízos da toxicidade do etanol durante o desenvolvimento fetal.

Na Parte II encontram-se os resultados obtidos divididos em dois capítulos compostos por um artigo científico cada um: o artigo 1, intitulado "*Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats*", foi publicado no periódico *Behavioural Brain Research* e o artigo 2, intitulado "*Prenatal exposure to moderate levels of ethanol can have long-lasting effects on hippocampal glutamate uptake in adolescent offspring*" encontra-se em preparação para submissão.

Na Parte III desta tese consta a discussão geral dos resultados, considerações finais, conclusões, perspectivas futuras e as referências bibliográficas.

Parte I

Resumo

Durante o desenvolvimento fetal, o sistema nervoso central (SNC) apresenta-se mais vulnerável aos efeitos tóxicos do etanol. Sabe-se que a exposição pré-natal sob altas doses de álcool aumenta a propensão de síndromes fetais. No entanto, muitas gestantes optam por manter o “beber social”, mesmo que estudos mostrem que doses moderadas de etanol na fase do desenvolvimento possa causar danos ao SNC associados a transtornos cognitivos, sociais e neuroquímicos. O objetivo desta tese é avaliar parâmetros astrogliais e comportamentais no período da adolescência em fatias hipocâmpais de ratos Wistar machos submetidos a um modelo animal de exposição pré e pós-natal sob doses moderadas de etanol. O modelo animal utilizou cerveja sem álcool para administração por via oral de etanol. As ratas foram expostas ao tratamento durante toda a gestação até o final do desmame. Ratas prenhas foram divididas em três grupos de tratamento: apenas água (grupo controle), cerveja sem álcool (grupo veículo) ou cerveja sem álcool adicionado de 10%v.v. etanol (MPAE group - *moderate prenatal alcohol exposure*). Filhotes adolescentes machos foram submetidos a tarefa de esQUIVA discriminativa passiva com o objetivo de avaliar o comportamento de aprendizado/memória e de ansiedade. No dia pós-natal 30 (DPN 30) o hipocampo foi dissecado e fatias foram obtidas para a imunocuantificação de GFAP, NeuN, S100B, receptores NMDA e para os transportadores gliais de glutamato, EAAT1 e EAAT2. O ensaio para dosagem da captação de glutamato, bem como o conteúdo de glutatona (GSH) também foram realizados. Os filhotes do grupo MPAE apresentaram comportamento do tipo ansiolítico, mesmo tendo aprendido a evitar o braço aversivo. Observamos neste grupo uma diminuição da captação de glutamato, que parece ser dose-dependente, além de alterações na quantificação dos receptores NMDA e dos transportadores de glutamato EAAT1 e EAAT2, que podem ter contribuído para os efeitos comportamentais encontrados. Os níveis da proteína S100B estavam claramente elevados no líquido cefalorraquidiano apenas no grupo MPAE e alterações na expressão de GFAP também foram evidenciadas neste grupo. Contudo, este trabalho mostra que mesmo doses moderadas de etanol, administradas durante o período do desenvolvimento fetal, podem interferir no comportamento de risco associado a diminuição da ansiedade, visto na fase da adolescência. Além disso, os resultados ressaltam uma maior vulnerabilidade do sistema glutamatérgico à toxicidade do etanol, bem como da possibilidade das células da glia participarem de uma resposta de ativação e reparo após o tratamento pré-natal com etanol.

Abstract

The central nervous system (CNS) is more vulnerable to ethanol effects during fetal development. It is known that high doses of prenatal ethanol exposure increases the probability of fetal alcohol syndromes. Women have chosen to continue drinking socially despite being pregnant, even with studies demonstrating that moderate doses of ethanol during development can impact the CNS leading to cognitive, social and neurochemical impairments. The aim of this thesis is evaluate glial and behavior parameters during adolescence period on hippocampal slices of male Wistar rats submitted to an animal model of prenatal and postnatal ethanol exposure under moderate dose. An animal model of oral self-administration of ethanol through a non-alcoholic beer was performed during the whole gestation period until weaning. The pregnant rats were divided in three treatment groups: only water (control group), non-alcoholic beer (vehicle group) or non-alcoholic beer with 10% v.v. added (MPAE group – moderate prenatal alcohol exposure). Adolescent male offspring were subjected to the discriminative passive avoidance task to evaluate the learning/memory and anxiety-like behavior. On postnatal day 30 (PND 30) hippocampi were dissected and slices were obtained for immunoquantification of GFAP, NeuN, S100B, NMDA receptors and for glial glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2. In addition, we measured the glutamate uptake, as well as the GSH content. Offspring from MPAE group presented an anxiolytic-like behavior, even though they had learned how to avoid the aversive arm. We observed a decrease in glutamate uptake, that seems to be dose-dependent, and alterations in the quantification of glutamate NMDA receptors and EAAT1 and EAAT2 transporters, that could contribute to the behavior findings. The S100B protein levels were clearly increased in the cerebrospinalfluid only for MPAE group and alterations in GFAP expression were also seen for this group. Nevertheless, this thesis shows that even moderate ethanol doses administered during fetal development can impact the risk taking behavior associated to reduction in anxiety, common seen during adolescence. Moreover, the results highlight a vulnerability of glutamate system associated to ethanol toxicity, as well as the possibility of glial cells are involved in an activated and repair response after prenatal ethanol treatment.

1 Introdução

1.1 Exposição Pré-natal ao Álcool

A exposição pré-natal ao álcool aumenta a propensão de síndromes fetais (*fetal alcohol spectrum disorders* – FASDs) (Abel, 1984; Streissguth et al., 1991; Guerri & Pascual, 2010) que vem tornando-se, cada vez mais, um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em países subdesenvolvidos (Valenzuela et al., 2012). A síndrome mais severa é a síndrome alcoólica fetal (SAF), identificada por uma série de características físicas e intelectuais, incluindo retardo de crescimento intra e extrauterino, retardo mental ou baixo coeficiente de inteligência (QI), dismorfismo facial e déficits comportamentais (Little & Wendt, 1991; Bell et al., 2014). Este quadro é frequentemente associado com consumo exagerado de álcool, chamado de consumo do tipo *binge*, em que a concentração de álcool no sangue é maior que 0.12 g/dl (equivalente a mais de 4-doses/hora) (Valenzuela et al., 2012). Estudos mostram que aproximadamente 50% das mulheres reportam consumir álcool logo antes do reconhecimento da gravidez (Floyd et al., 1999; Grant et al., 2009; Hamilton et al., 2010) e 18% continuam a consumir mesmo após o reconhecimento da gravidez (Peadon et al., 2011; Walker et al., 2011). No entanto, essas taxas variam muito de um país para outro; na Austrália cerca de 81% das mulheres reportaram consumir alguma quantidade de álcool durante a gestação (Walker et al., 2011).

O sistema nervoso central (SNC) é vulnerável aos efeitos tóxicos do etanol, especialmente no período do desenvolvimento fetal. As consequências

negativas não estão limitadas apenas às altas doses de álcool durante a exposição pré-natal (Hamilton et al., 2010), visto que doses moderadas podem causar danos cerebrais associados a transtornos cognitivos, sociais e neuroquímicos apresentados logo na infância e na adolescência (Savage et al., 2002; Guerri & Pascual, 2010; Eckardt et al., 1998). Embora seja amplamente aceito na literatura científica que doses elevadas de etanol associam-se a efeitos duradouros e prejudiciais no desenvolvimento cerebral dos descendentes, o caso para exposição moderada ainda é discutível (Valenzuela et al., 2012; Brady et al., 2013; Sanchez Vega et al., 2013). No entanto, estudos tem mostrado que doses moderadas de etanol durante o período gestacional tem aumentado a incidência de abortos espontâneos e o risco para transtornos comportamentais na infância e na adolescência (Blume, 1985; Sanchez Vega et al., 2013; Zuccolo et al., 2013), sendo o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) a doença psiquiátrica mais frequentemente diagnosticada (Fryer et al., 2007).

O desenvolvimento cerebral ocorre com uma série de eventos progressivos e regressivos, todos estes regulados pelo ambiente e interações celulares (Tsuji et al., 2008; Chen et al., 2003). Enquanto a formação do SNC ocorre logo no período de embriogênese, o desenvolvimento continua acontecendo até a fase da adolescência. É importante lembrar que existe um período do desenvolvimento encefálico em que o SNC é extremamente sensível a estímulos e substâncias químicas exógenas, esse período é chamado de pico do desenvolvimento encefálico (*brain growth spurt*) (Levitt, 1998; Dobbing & Sands, 1979). Eventos como a proliferação de células gliais, e desenvolvimento de axônios e dendritos, incluindo a sinaptogênese, ocorrem nesse período (Dobbing

& Sands, 1979). Em roedores, esses eventos geralmente ocorrem durante os dias pós-natal (DPN) 4-10, equivalente em humanos ao terceiro trimestre gestacional (Bayer et al., 1993). Outro período crítico é o de proliferação e migração celular, que ocorre em humanos entre a 7^a e a 20^a semana de gestação (Suzuki, 2007) e em ratos do dia gestacional (DG) 12-21 (Guerra & Pascual, 2010). Logo, a exposição de filhotes ao álcool durante esses períodos críticos do desenvolvimento pode levar a efeitos prejudiciais ao desenvolvimento do SNC (Diaz & Samson, 1980), incluindo efeitos comportamentais, como déficits de atenção, memória e aprendizagem, transtornos de ansiedade e de humor (Thomas et al., 2000; Dobson et al., 2012; Sood et al., 2001; Burger et al., 2011), além de danos físicos, como microcefalia (Ikonomidou et al., 2000; Tsuji et al., 2008).

O etanol é considerado uma substância neurotóxica, com efeitos metabólicos e teratogênicos (de la Monte & Kril, 2014), sendo capaz de prejudicar diretamente diferentes canais iônicos, receptores e enzimas, além de alterar a atividade glutamatérgica e gabaérgica (Chen et al., 1997; Smith et al., 2014). Esses efeitos contribuem para mudanças na funcionalidade e na plasticidade sináptica do SNC em desenvolvimento (Vengeliene et al., 2008; Zorumski et al., 2014). No entanto, o etanol induz toxicidade por mecanismos ainda não totalmente conhecidos. Dentre as áreas cerebrais mais vulneráveis aos seus efeitos, o hipocampo em desenvolvimento é uma das regiões mais prejudicadas (Guerra & Pascual, 2010). Entretanto, os efeitos e mecanismos pelos quais o etanol pode prejudicar o desenvolvimento cerebral estão intimamente

correlacionados ao tempo de exposição, ao padrão de consumo (agudo ou crônico) e aos fatores genéticos envolvidos (Goodlett et al., 2005)

1.2 Modelo animal de exposição ao etanol

Sabe-se que ratos que consomem álcool tanto de forma aguda quanto de forma crônica, apresentam alterações comportamentais similares às observadas em humanos, como a diminuição da ansiedade e da coordenação motora, além de apresentarem sinais característicos da abstinência, como a diminuição de interação social (Gallate et al., 2003; Hargreaves et al., 2011). A escolha pelo modelo de exposição pré-natal ao álcool utilizando a cerveja sem álcool como veículo apresenta algumas vantagens em relação aos demais modelos, como por exemplo, a palatabilidade, a via de administração sem causar estresse para o animal e o fácil acesso de consumo, além do modelo ser econômico e sob o paradigma de livre-escolha, ou seja, o animal tem disponível tanto água como cerveja sem álcool (Samson et al., 1996).

Existem diferentes paradigmas experimentais utilizando roedores para estudar os efeitos do etanol no SNC. De maneira geral, algumas variáveis devem ser previamente definidas e controladas no delineamento de um modelo de exposição pré-natal a fim de evitar fatores confundidores. A espécie do animal, a via de administração, a dose, o tempo de exposição, a farmacocinética da substância e os fatores de cuidado nutricional materno são de fundamental importância para um delineamento correto do estudo (Levitt, 1998).

Os estudos mais recentes que administram doses moderadas de etanol tem utilizado paradigmas de exposição que permitem acessar os efeitos do etanol em diferentes regiões encefálicas com o mínimo de estresse para o animal. Caixas operantes com etanol vaporizado (Vendruscolo & Roberts, 2013), dieta líquida (Helfer et al., 2014; Worrall et al., 2000), gavagem (Brocardo et al., 2011) e o consumo oral de etanol através de um veículo (água, água doce ou cerveja sem álcool) (Hargreaves et al., 2011; Gallate et al., 2003; Garth A Hargreaves et al., 2009) tem sido os modelos de escolha para administração de etanol sob doses moderadas.

Lancaster e colaboradores observaram que ratas fêmeas consomem cerveja sem álcool em maiores quantidades que os machos, mostrando que elas preferem cerveja sem álcool à água (Lancaster & Spiegel, 1989; Lancaster & Spiegel, 1992). Entretanto, quando os animais foram expostos simultaneamente a cerveja com álcool (5% de teor alcoólico) e a cerveja sem álcool, num paradigma de livre escolha, eles preferiram a cerveja sem álcool, ingerindo-a em maiores quantidades. Esse estudo sugere que a palatabilidade e a concentração alcoólica são fatores importantes a serem considerados quando se utiliza um modelo de administração oral e de livre escolha (Samson et al., 1996).

1.3 Etanol e a glia

Embora os neurônios sejam o principal alvo nos mecanismos envolvidos nos efeitos do etanol, estas células não são as únicas no comando da sustentação e regulação da neurotransmissão (Araque et al., 1999). As células gliais, especialmente os astrócitos, apresentam um papel essencial na regulação da

neurotransmissão glutamatérgica e gabaérgica, no metabolismo de neurotransmissores, no suprimento de substratos energéticos para a transmissão sináptica (Miguel-Hidalgo, 2009) e no desenvolvimento do SNC (Guerra & Renau-Piqueras, 1997).

Dentre as estruturas mais afetadas pelo etanol destacam-se as disfunções no córtex pré-frontal, no hipocampo, no núcleo acumbens e na área tegmental ventral (Guerra & Renau-Piqueras, 1997). O alcoolismo tem sido associado com várias anormalidades encefálicas-gliais, incluindo déficit na neurotransmissão glutamatérgica, cuja modulação extracelular é feita essencialmente pelos astrócitos (Smith et al., 2014). Estudos clínicos e experimentais mostram que a exposição ao etanol durante a embriogênese é capaz de reduzir o conteúdo de glia radial, e, assim, interferir na sua transformação em astrócitos maduros (Rubert et al., 2006).

O etanol é capaz de afetar diretamente algumas funções gliais (Guerra & Renau-Piqueras, 1997; Guerra & Pascual, 2010), interferindo na morfologia (Guerra, 1998) e nos processos do desenvolvimento, como no suporte de substâncias tróficas para e a modulação e formação de sinapses maduras (Pascual & Guerra, 2007). Os efeitos da exposição pré-natal ao álcool em células neuronais são bem descritos na literatura, principalmente com doses elevadas de etanol, mostrando tanto prejuízo funcional como morte neuronal (Goodlett & Lundahl, 1996; Ikonomidou et al., 2000). Já nas células gliais, sabe-se que o efeito agudo e concentração elevada de etanol no sangue interferem diretamente no desenvolvimento (Guerra & Renau-Piqueras, 1997; Burger et al., 2011). No entanto, ainda pouco se sabe sobre os efeitos do etanol na glia após exposição

sob doses moderadas durante o período pré-natal (Aronne et al., 2011; Uban et al., 2010).

1.3.1 Astrócitos

As células neuronais e gliais basicamente constituem o SNC. As células gliais são subdivididas em micróglia, células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória; macroglia, composta por oligodendrócitos, formadores da mielina; células ependimais, que revestem os ventrículos cerebrais; e astrócitos (Perea & Araque, 2010). Os astrócitos podem ser classificados em dois subtipos principais: astrócitos protoplasmáticos, encontrados em maior concentração na substância cinzenta, e astrócitos fibrosos, localizados principalmente na substância branca cerebral. Existem ainda astrócitos especializados, encontrados em estruturas específicas, como a glia de Bergmann no cerebelo, as células de Müller na retina e os pituícitos na neurohipófise (Kimelberg & Norenberg, 1989).

Em 1895, Santiago Ramóny Cajal propôs que os astrócitos eram as principais células gliais e que seus processos atuavam ativamente nas sinapses facilitando a comunicação neurônio-glia (García-Marín et al., 2007). Hoje, mais de um século depois, sabe-se que ele estava certo, os astrócitos apresentam estrutura e funções intimamente associados aos neurônios, inclusive, são capazes de modular comportamentos (Halassa et al., 2009). Apesar de os astrócitos serem as células mais abundantes do SNC, somente nas últimas décadas chamaram a atenção, não apenas como o suporte estrutural para os neurônios, mas também passaram a ser reconhecidos por sua capacidade dinâmica, sua plasticidade e sua diversidade funcional (Shao & McCarthy, 1994).

Os astrócitos participam ativamente da sinapse, mostrando ser um elemento fundamental na captação, modulação e plasticidade sináptica (Perea & Araque, 2010). Regulam a neurogênese e gliogênese, e estabelecem interações recíprocas com outros tipos celulares do SNC, como neurônios, células endoteliais, oligodendrócitos, microglia e células ependimais (Horner & Palmer, 2003). Os astrócitos estão organizados de modo que seus domínios não se sobrepõem e apenas suas projeções membranosas muito finas fazem contato com a vizinhança (Bushong et al., 2002; Halassa & Haydon, 2010). Por exemplo, na área CA1 do hipocampo os processos astrocíticos são capazes de participar em cerca de 40-60% das sinapses (Bernardinelli et al., 2014) e este processo de cobertura das sinapses parece ser regulado pela atividade sináptica de maneira bastante móvel e dinâmica, permitindo a essas células atuarem em diferentes funções (Haber et al., 2006).

Embora os astrócitos não sejam células excitáveis, não apresentando a maquinaria necessária para a geração de potencial de ação, eles exibem mudanças nas suas propriedades elétricas, como o tamponamento de níveis extracelulares dos íons (Walz, 1989), que são essenciais para a atividade neuronal (Halassa & Haydon, 2010). Dentre as inúmeras funções exercidas pelos astrócitos pode-se ainda citar a participação na formação da barreira hematoencefálica (Abbott et al., 2006), a produção de fatores tróficos (Eriksen & Druse, 2001), o metabolismo de neurotransmissores (Kimelberg & Katz, 1985) e o suporte energético para os neurônios (Pellerin, 2005). Além disso, os astrócitos, juntamente com a microglia, são as principais células efetoras de resposta imune inata no SNC, exibindo um fenótipo ativado frente a substâncias tóxicas e em doenças neurodegenerativas, produzindo diversos mediadores

inflamatórios (Hauwel *et al.* , 2005, Wyss-Coray and Mucke, 2002). Logo, há várias oportunidades para modificação da atividade sináptica, sugerindo que os astrócitos podem apresentar uma influência potencial em comportamentos complexos como o reforço por recompensa, observados no abuso de substâncias como o etanol (Miguel-Hidalgo, 2009). O etanol é capaz de alterar funções astrocíticas, contribuindo tanto para o comportamento de dependência como também na modulação da plasticidade sináptica durante o desenvolvimento (Zorumski *et al.*, 2014; Brolese *et al.*, 2014).

1.3.2 Proteína S100B

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, pertencente à família das proteínas S100, assim denominadas por serem solúveis em solução 100% de sulfato de amônia (Moore, 1965). No SNC, os astrócitos são responsáveis pela maior parte da expressão da proteína S100B, além de serem capazes de promover a secreção dessa proteína de maneira regulada (Gonçalves *et al.*, 2008). Essa proteína está envolvida em diversas tarefas intra e extracelulares (Donato, 2001; Nardin *et al.*, 2009). Dentre as funções intracelulares destacam-se a inibição da fosforilação protéica (Scotto *et al.*, 1998), a regulação da atividade enzimática, a modulação do citoesqueleto e a regulação do crescimento e a diferenciação celular (Sen & Belli, 2007). No meio extracelular, estudos *in vitro* mostram que a S100B em concentrações baixas (picomolar) apresenta efeitos tróficos, como o crescimento de neuritos (Kligman & Marshak, 1985), o aumento da sobrevivência neuronal após algum tipo de dano no SNC (Kleindienst & Ross Bullock, 2006) e a modulação da função sináptica, através da captação de glutamato (Tramontina *et al.*, 2006). No entanto, quando em concentrações na

ordem de micromolar, a S100B pode ser tóxica, levando à produção de óxido nítrico (NO) pelos astrócitos vizinhos e microglia (Petrova et al., 2000) e à ativação de cascatas apoptóticas mediadas pelo receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE), gerando um quadro de disfunção e morte neuronal (Van Eldik & Wainwright, 2003).

Sabe-se que a S100B extracelular atua como uma citocina neurotrófica, podendo ser classificada como marcador de dano cerebral em diferentes patologias (Gonçalves et al., 2008; de Souza et al., 2009) como na síndrome de Down (Netto et al., 2005; Sen & Belli, 2007), na doença de Alzheimer (Li et al., 2011), na esquizofrenia (Steiner et al., 2014), em transtornos de humor (Mann et al., 2004) e também em pacientes alcoolistas (Brin et al., 2011). A S100B apresenta um potencial valor terapêutico, à medida que desempenha o papel de “biomarcador” perante um dano como na isquemia ou no traumatismo crânio encefálico (Kleindienst & Ross Bullock, 2006). Essa proteína pode atravessar a barreira hematoencefálica, sendo que concentrações basais aumentadas, devido à lesão cerebral, podem ser determinadas no soro (Marchi et al., 2004). Um estudo mostrou que pacientes alcoolistas que internaram para o processo de desintoxicação apresentaram níveis aumentados de S100B logo que internam, e esses níveis reduziram ao longo das semanas durante a abstinência (Liappas et al., 2006; Brin et al., 2011). Além disso, um estudo feito com ratos expostos ao etanol mostrou que um tratamento preventivo feito com S100B durante o desenvolvimento preveniu a redução do número de neurônios serotoninérgicos por apoptose (Druse et al., 2007; Wedekind et al., 2011).

1.3.3 Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)

A GFAP é uma proteína de 50 kD expressa exclusivamente em astrócitos no SNC (Baba et al., 1997). É a principal proteína dos filamentos intermediários, constituindo o citoesqueleto dos astrócitos maduros (Rutka et al., 1997; Gomes et al., 1999). Durante a maturação do astrócito ocorre uma troca da expressão da proteína vimentina pela GFAP sendo este um marco do desenvolvimento (Gomes et al., 1999; Eng et al., 2000). É importante na mobilidade e morfologia, provendo estabilidade estrutural para os processos astrocíticos (Eng et al., 2000). Após um processo de dano, trauma, ou um insulto químico, os astrócitos tornam-se mais reativos e respondem com aumento rápido da síntese de GFAP, processo este chamado de astrogliose (Baba et al., 1997; Eng et al., 2000; Gottfried et al., 1999).

A exposição pré-natal ao álcool pode induzir alterações na proliferação e diferenciação dos astrócitos sugerindo que o etanol seja capaz de afetar os principais precursores dos astrócitos, a glia radial (Guerra & Renau-Piqueras, 1997; Vallés et al., 1996). *In vitro*, culturas de astrócitos são profundamente alteradas pela exposição crônica ao etanol (Ramos et al., 2002). A exposição pré e pós-natal de filhotes ao etanol, mesmo durante exposições breves e sob doses moderadas, é capaz de alterar a expressão de GFAP e de seu mRNA, principalmente durante o desenvolvimento do SNC (Fletcher & Shain, 1993; Guerra & Renau-Piqueras, 1997). No entanto, observa-se que esse efeito pode ser reversível após a fase equivalente ao terceiro trimestre gestacional em ratos (gliose transiente) (Goodlett et al., 1993) e que diferenças regionais quanto à vulnerabilidade aos efeitos neurotóxicos do etanol em relação a GFAP são

também observadas (Valenzuela et al., 2012). Por exemplo, no hipocampo, a região de CA3 é mais vulnerável que CA1 e que o giro denteado (Franke et al., 1997).

1.3.4 Sistema glutamatérgico

O tecido cerebral apresenta uma notável habilidade de acumular glutamato, sendo este o principal neurotransmissor mediador de sinais excitatórios no SNC de mamíferos (Danbolt, 2001). O glutamato está envolvido em muitos aspectos das funções normais cerebrais; incluindo cognição, memória e aprendizado (Fonnum, 1984), além de também apresentar um papel importante no desenvolvimento do SNC, incluindo a indução e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte celular (Rabacchi et al., 1992; Pearce et al., 1987). Este neurotransmissor exerce seu papel sinalizador ao ligar-se aos receptores localizados na superfície da membrana das células (existente tanto em neurônios como em astrócitos) (Steinhäuser & Gallo, 1996; Hösli & Hösli, 1993), sendo que a sua concentração no fluido extracelular é quem determina a intensidade da estimulação ao receptor (Danbolt, 2001). Por isso, é de fundamental importância que a concentração de glutamato no meio extracelular mantenha-se controlada, pois tanto excesso quanto a falta desse neurotransmissor podem levar ao dano (Zhou & Danbolt, 2014). O aumento de glutamato extracelular e o excesso de ativação dos receptores glutamatérgicos pode ser tóxico para as células, levando à morte neuronal (excitotoxicidade) (McDonald et al., 1998; Olney, 1990).

Considerando a grande quantidade de glutamato existente no SNC (5-15 nmol por Kg dependendo da região) e a importância de controlar as

concentrações extracelulares, parece lógico que existam sistemas de mecanismo de proteção (Schousboe & Hertz, 1981). Como o glutamato não é convertido quando liberado, o tecido cerebral possui uma alta atividade de captação para proteger-se da toxicidade (Jabaudon et al., 1999). Um dos papéis mais importantes dos astrócitos é a captação do glutamato sináptico extracelular (McKenna, 2013). Os astrócitos possuem transportadores que utilizam o gradiente de íons sódio, potássio e também de hidrogênio como fonte de energia para esse processo (Levy et al., 1998). Os transportadores EAAT 1 e EAAT 2 (transportadores de aminoácido excitatório) (Tanaka, 1993; Pines et al., 1992) são predominantemente expressos em astrócitos (Danbolt et al., 1992) no hipocampo, córtex e gânglios da base e tem a função de captar o glutamato para o meio intracelular (Torp et al., 1994). O glutamato pode ser metabolizado via ciclo do ácido tricarboxílico e ser utilizado na síntese de proteínas ou ser convertido em glutamina pelo ciclo glutamato-glutamina (Boulland et al., 2002).

Os receptores ionotrópicos de glutamato do tipo AMPA, NMDA e cainato (Ozawa et al., 1998) são ativados rapidamente juntamente com a condutância de sódio, potássio e cálcio, ao contrário da ativação dos receptores metabotrópicos de glutamato que são acoplados a proteínas G e respondem mais lentamente (Steinhäuser & Gallo, 1996). Os receptores do tipo NMDA são canais dependentes de voltagem, compostos por uma combinação de subunidades (NR1 ou NR2), altamente permeáveis ao cálcio e que medeiam a transmissão excitatória (Mayer & Westbrook, 1985).

O alcoolismo tem sido associado a alterações funcionais da neurotransmissão glutamatérgica (Tsai, 1998). O etanol é capaz de interagir com

várias proteínas importantes para a transmissão sináptica, atuando como antagonista dos receptores NMDA (Lovinger et al., 1990) durante a exposição aguda (Möykkynen & Korpi, 2012) ou aumentando a sua expressão durante a exposição crônica e abstinência (Kumari & Ticku, 2000; Chen et al., 1997; Follesa & Ticku, 1996). Durante a exposição aguda, a inibição dos receptores NMDA tem sido correlacionada com prejuízos comportamentais envolvendo prejuízo no processo de memória e aprendizagem (Silvers et al., 2003) e também a uma diminuição da ansiedade (Kotlinska & Bochenski, 2008).

A exposição aguda ao etanol aumenta a liberação de glutamato (Möykkynen & Korpi, 2012), bem como a atividade astrocítica do transporte do glutamato (Foley & Rhoads, 1992; Smith et al., 2014). No entanto, ao utilizar um bloqueador dos transportadores EAAT 2, ocorre um aumento do glutamato extracelular, aumentando a sinalização glutamatérgica podendo levar a excitotoxicidade (Smith et al., 2014). Contudo, ainda faltam estudos que mostrem os efeitos do etanol na captação de glutamato e nos receptores NMDA após a exposição sob doses moderadas de álcool durante o período do desenvolvimento.

A exposição pré-natal ao etanol causa um aumento do estresse oxidativo em vários órgãos durante desenvolvimento, inclusive no SNC (Brocardo et al., 2011). E até mesmo exposições breves durante a gravidez podem estar correlacionadas a alterações do estado redox que levam à apoptose e até teratogênese (Dong et al., 2010). O glutamato também pode ser substrato para a síntese do tripeptídeo glutathiona (GSH; L-glutamil-L-cisteinil-glicina), um dos principais sistemas de defesa antioxidante do SNC (Dringen & Hirrlinger, 2003).

A GSH é essencial para proliferação celular e manutenção do potencial redox. Esse sistema é importante para a defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (ERO), à medida que altas concentração de GSH protege contra uma variedade de diferente ERO, reagindo diretamente com radicais em reações não-enzimáticas (Cotgreave & Gerdes, 1998).

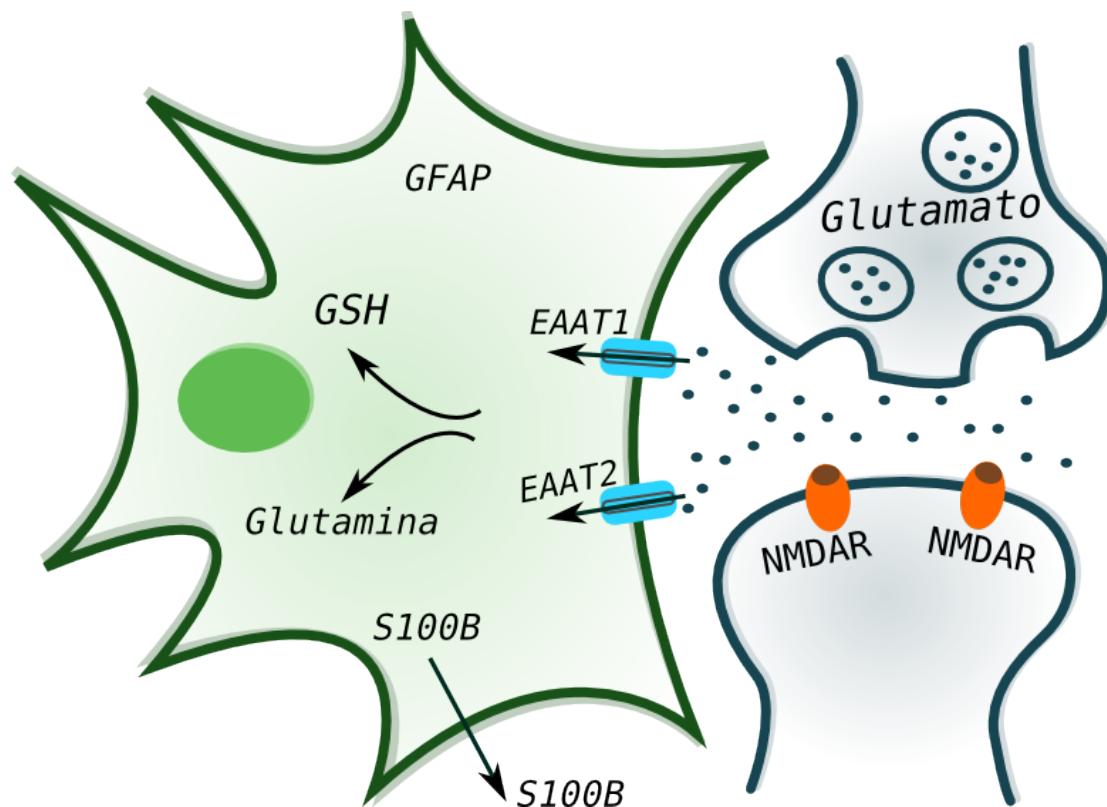


Figura 1 Ilustração de uma sinapse tripartite. O glutamato liberado na fenda sináptica exerce seus efeitos ligando-se aos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. O glutamato extracelular é captado pelo astrócito através de transportadores glias específicos EAAT1 e EAAT2. O glutamato pode tanto ser convertido em glutamina como servir para síntese de GSH, uma das principais defesas antioxidantes. O astrócito ainda apresenta marcadores específicos, como a S100B, que pode ser secretada e atuar como um fator trófico, promovendo a diferenciação e crescimento neuronal, e a GFAP, que constitui o citoesqueleto de astrócitos maduros.

1.4 Comportamento e Exposição Pré-natal ao Etanol

A exposição pré-natal ao álcool tem sido associada com uma maior incidência de distúrbios comportamentais e cognitivos em crianças e adolescentes (Olson et al., 1998; Sood et al., 2001), incluindo déficit de atenção (Burden et al., 2005; Berman & Hannigan, 2000), de memória (Burden et al., 2005; Livy et al., 2003), de aprendizagem (Dobson et al., 2012) e distúrbios de ansiedade (Hofmann et al., 2005). Crianças expostas ao álcool no período pré-natal mostram maiores dificuldades em habilidades escolares e prejuízo no QI ao serem comparadas com crianças não expostas (Howell et al., 2006). Pesquisas tem mostrado que os efeitos deletérios, tanto neurobiológicos como comportamentais, ocasionados pela exposição ao etanol são tempo e dose dependentes, incluindo também a duração da abstinência materna (Crews & Nixon, 2009; Cooper et al., 2012).

Roedores expostos ao etanol no período pré-natal mostram comportamento e características físicas semelhantes às características encontradas em crianças expostas ao álcool durante a gestação (Abel, 1996). O etanol ingerido no período pré-natal pode interferir no desenvolvimento do sistema GABAérgico dos filhotes, pois mudanças comportamentais observadas parecem mostrar hiperatividade, hiperresponsividade e/ ou déficit nas respostas inibitórias (Osborn et al., 1998). Filhotes, tanto machos quanto fêmeas, expostos ao etanol prenatalmente mostraram aumento do comportamento exploratório de novos ambientes e alteração no comportamento na tarefa do labirinto em cruz elevado (J.A. Osborn et al., 1998). Os filhotes que permanecem mais tempo nos braços aberto do aparato apresentavam níveis mais elevados de

corticotropina (maior index para estresse) (Sudakov, 2008). Considera-se que quanto mais tempo gasto no braço aberto do aparato menor é a sensação de medo e maior o comportamento de risco quando comparado com a permanência no braço fechado (Lister, 1987).

De maneira similar aos estudos clínicos, estudos com animais mostram que a administração aguda de etanol leva a prejuízos de aprendizado e memória, já vistos em diferentes tarefas comportamentais, incluindo tarefas como: medo condicionado (Gulick & Gould, 2009), labirinto aquático de Morris (Berry & Matthews, 2004), reconhecimento de objetos (Ryabinin et al., 2002), labirinto radial (Hoffmann & Matthews, 2001) e tarefas de esquiva (Gulick & Gould, 2011; Bammer & Chesher, 1982). No entanto, alguns estudos tem proposto que o comportamento do tipo ansioso e de memória não estão apenas relacionados um com o outro, mas que a ansiedade é um fator necessário para a aprendizagem e para a formação da memória (Mathews, 1990). Apesar da íntima correlação, memória e ansiedade tem sido estudadas separadamente. A tarefa de esquiva passiva discriminativa (*plus maze discriminative avoidance task* - PMDAT) foi desenvolvida por Frussa-Filho e colaboradores afim de propor a interação entre os comportamentos de memória/aprendizado e ansiedade numa mesma tarefa (Silva et al., 1997). A tarefa conta com o aparato clássico do labirinto em cruz elevado, onde um dos braços fechados é modificando para tornar-se aversivo. Num primeiro momento, o animal é condicionado a evitar este braço fechado aversivo (Silva et al., 1997; Silva et al., 2002), num segundo momento, ele é reexposto ao aparato sem o estímulo aversivo. Assim, diferentes drogas, como anfetamina (Silva et al., 2002), naltrexona (Silva & Frussa-Filho, 2002),

clordiazepóxido e cafeína (Silva & Frussa-Filho, 2000), incluindo a administração aguda de etanol (Sanday et al., 2013), já foram testadas e avaliadas com o objetivo de verificar a influência da substância tanto na memória e no aprendizado como no comportamento do tipo ansioso. A tarefa tem se mostrado eficiente tanto para avaliação de aumento ou melhora do aprendizado/memória como também para estudar drogas com efeito amnésico (Silva & Frussa-Filho, 2000). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre esses parâmetros no período da adolescência, após a administração pré-natal de etanol sob doses moderadas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do etanol em parâmetros astrocíticos e comportamentais utilizando fatias hipocâmpais de ratos Wistar machos adolescentes expostos a doses moderadas de etanol durante a gestação e lactação.

2.2 Objetivos Específicos

Após o modelo de exposição pré e pós-natal ao etanol, avaliar:

Na adolescência (DPN 30):

- O comportamento de aprendizagem, memória e ansiedade através da tarefa de esQUIVA discriminativa passiva (PMDAT)

No hipocampo:

- O conteúdo e expressão das proteínas GFAP e S100B e NeuN;
- A integridade e a viabilidade celular;
- A captação de glutamato;
- A quantificação dos receptores NMDA;
- A quantificação da expressão dos transportadores glias de glutamato, EAAT 1 e EAAT 2;
- O conteúdo de glutatona reduzida;

No líquido cefalorraquidiano (LCR):

- O conteúdo da proteína S100B;

Nas ratas fêmeas (mães):

- Os níveis de etanol no sangue;
- O consumo de solução alcoólica durante o tratamento.

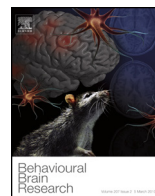
Parte II

Artigo 1

A primeira parte dos resultados foi publicada no periódico Behavioural Brain Research. V. 269, 175–184. 2014 sob a forma de artigo intitulado:

Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats

O referido artigo segue abaixo.



Research report

Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats



Giovana Brolese^a, Paula Lunardi^b, Núbia Broetto^a, Douglas S. Engelke^c, Franciane Lírio^b, Cristiane Batassini^b, Ana Carolina Tramontina^d, Carlos-Alberto Gonçalves^{a,b,*}

^a Neuroscience Post-Graduation Program – Basic Science Health Institute – Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Brazil

^b Biochemistry Department – Basic Science Health Institute – Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Brazil

^c Neurophysiology Department – Federal University of São Paulo – UNIFESP, Brazil

^d State University of Rio Grande do Sul – UERGS, Brazil

HIGHLIGHTS

- Prenatal alcohol exposure affects behavior (anxiety and cognition) in offspring.
- The beer model was used to investigate moderate prenatal alcohol exposure.
- Neuronal and glial targets were evaluated in hippocampus (NMDAR, NeuN, GFAP, S100B).
- Results showed anxiolytic-like behavior and changes in memory/learning process.
- NMDAR and S100B increments were observed in hippocampus.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2013

Received in revised form 18 March 2014

Accepted 14 April 2014

Available online 28 April 2014

Keywords:

Alcohol

Anxiety

GFAP

Hippocampus

NMDA receptor

S100B

ABSTRACT

Alcohol consumption by women during gestation has become increasingly common. Although it is widely accepted that exposure to high doses of ethanol has long-lasting detrimental effects on brain development, the case for moderate doses is underappreciated, and benchmark studies have demonstrated structural and behavioral defects associated with moderate prenatal alcohol exposure in humans and animal models. This study aimed to investigate the influence of in utero exposure to moderate levels of ethanol throughout pregnancy on learning/memory, anxiety parameters and neuroglial parameters in adolescent offspring. Female rats were exposed to an experimental protocol throughout gestation up to weaning. After mating, the dams were divided into three groups and treated with only water (control), non-alcoholic beer (vehicle) or 10% (v/v) beer solution (moderate prenatal alcohol exposure – MPAE). Adolescent male offspring were subjected to the plus-maze discriminative avoidance task to evaluate learning/memory and anxiety-like behavior. Hippocampi were dissected and slices were obtained for immunoquantification of GFAP, NeuN, S100B and the NMDA receptor. The MPAE group clearly presented anxiolytic-like behavior, even though they had learned how to avoid the aversive arm. S100B protein was increased in the cerebrospinal fluid (CSF) in the group treated with alcohol, and alterations in GFAP expression were also shown. This study indicates that moderate ethanol doses administered during pregnancy could induce anxiolytic-like effects, suggesting an increase in risk-taking behavior in adolescent male offspring. Furthermore, the data show the possibility that glial cells are involved in the altered behavior present after prenatal ethanol treatment.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: MPAE, moderate prenatal alcohol exposure; PMDAT, plus-maze discriminative avoidance task; CSF, cerebrospinal fluid; BEL, blood ethanol levels.

* Corresponding author at: Departamento Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5567; fax: +55 51 3308 5535.

E-mail address: casg@ufrgs.br (C.-A. Gonçalves).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.023>

0166-4328/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alcohol consumption by women during gestation has become increasingly common [1,2]. Many countries do not have a clear recommendation regarding alcohol abstinence during gestation, and this might be confusing for women who may wish to continue “social drinking” during gestation [3,4]. Studies show that 10–20%

of North American women consume alcohol during pregnancy, 40% in Uruguay and up to 50% in some parts of Italy [5,6]. Although it is widely accepted that excess alcohol intake affects the brain and has long-lasting detrimental effects on brain development [7], the case for moderate consumption is underappreciated, and benchmark studies have demonstrated structural and behavioral deficits associated with moderate prenatal alcohol exposure in humans and animal models [8,9].

Moderate prenatal ethanol consumption has been shown to be associated with a higher incidence of behavioral and cognitive problems in childhood and/or adolescence, including deficits in working memory, anxiety, and mood disorders [10,11]. In fact, the developing hippocampus is one of the areas of the brain that are most vulnerable to the effects of alcohol [12]. However, the range of alcohol-related disorders may be due, in part, to differences in the duration, timing and pattern of alcohol exposure. Regarding the variability of experimental protocols using rodents to study the effects of alcohol [13,14], the “beer model” has been an alternative to oral beer delivery without stressing the animal in order to evaluate the response to ethanol exposure [15–17]. It also allows animal exposure to ethanol for a very long period of time. As an effective behavioral tool to evaluate the diversity of ethanol effects, the plus-maze discriminative avoidance task (PMDAT) has been used extensively. In fact, several studies performed with this task were able to concomitantly evaluate learning/memory, anxiety-like behavior and motor activity [18–20].

The severe effects produced by ethanol during the brain growth spurt, which is both prenatal and early-postnatal in rats [21–23], including morphologic and functional alterations, affect the balance of synaptic plasticity and alter the protective and supportive functions of glia [24]. One of the main functions of astrocytes is glutamate uptake from the tripartite synapse. It is generally accepted that the glutamatergic synapse, and in particular NMDA receptor (NMDAR) function, is sensitive and easily inhibited by ethanol [25–27]. NMDAR have received considerable attention because the levels and subcellular localization of these receptors impact the cellular processes underlying learning and memory, as well as various forms of synaptic plasticity. Studies have found that NMDAR are significantly affected by prenatal alcohol exposure [28,29]. In particular, researchers have focused on NMDAR in the hippocampal formation, as this area of the brain has been shown to be particularly vulnerable to the effects of fetal alcohol exposure and is known to be densely populated with NMDAR [30]. Therefore, any changes caused by the influence of ethanol on glutamate system could alter glutamate receptor function, which may in turn be reflected in an individual's behavior.

Glial cells are involved in many functions of the central nervous system (CNS), including synaptogenesis, interaction with cytoskeletal proteins, neuronal survival and synaptic plasticity [31]. Although glial fibrillary acidic protein (GFAP) appears to play a critical role in the morphogenesis of the CNS, the effects of moderate prenatal ethanol doses on GFAP expression remain unclear. Another important glial marker is S100B, a calcium binding protein that is expressed and secreted by astrocytes and implicated in glial-neuronal communication; it has been shown to directly interact with cytoskeletal proteins, including GFAP [32]. S100B induces GFAP expression, thereby increasing astrocyte branching [33,34], modulates synaptic plasticity by depressing long-term potentiation, and has some important effects on neuronal and astroglial metabolic pathways [35]. In addition, clinical data suggest that blood alcohol concentrations far in excess of 100 mg/dL are associated with increased S100B levels in alcohol-intoxicated patients [36].

Accordingly, the present study hypothesized that moderate ethanol consumption during the prenatal period can alter the astroglial response, in turn affecting astrocyte parameters and

behavior. The molecular targets in the developing brain that underlie the deleterious effects of moderate ethanol intake are largely unknown and no efficient treatment is currently available [13]. In this work, we aimed to investigate the influence of moderate prenatal ethanol exposure on learning/memory and anxiety in adolescent male offspring and its impact on astrocyte parameters. The beer model was employed as an experimental protocol for standard pregnant female laboratory rats that consumed moderate amounts of alcohol, without requiring food or water deprivation.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Nulliparous female Wistar rats, initially weighing 190–240 g were maintained on a 12:12-h light/dark cycle (7:00 a.m.–7:00 p.m. light phase). The room temperature was held constant (21–22 °C). All animals were given *ad libitum* access to water and standard rat chow (Nuvital S/A) throughout the study. Females were controlled according to their estrous cycle. They were mated on estrous or proestrous during the dark phase. The morning of the day after, if spermatozoa were found, was defined as gestational day one (GD 1). After mating, dams were assigned to one of the three groups that consumed water ($n = 8$, control), non-alcoholic beer ($n = 8$, vehicle) or 10% beer solution (moderate prenatal alcohol exposure – MPAE, $n = 8$ non-alcoholic beer + 10% (w/v) ethanol) throughout gestation and until their pups were weaned. The dams were housed individually in order to control fluid intake. Rat chow was available *ad libitum* until the end of the study. Every day at 4:00 p.m., the bottles with beer solution (volume of 50 mL) were changed for fresh ones. It is important to emphasize that only adolescent male offspring (PND 30) were used for the subsequent analysis. Also, to minimize the influence of the “litter effect”, we collected only two male offspring from each litter (PND 30), and multiple litters were used for the same analysis for both the behavioral test and the immunological assays. As shown in the experimental design (Fig. 1), this study was performed in two sets. Both included 24 dams divided into three groups, as described above. In the first set, after beer treatment, we conducted behavioral tasks with the male offspring ($n = 27$, not included in other experiments) and performed biochemical analyses. In the second set, we performed only biochemical analyses. All animal use and care procedures were in accordance with the National Institutes of Health guidelines and were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care Committee.

2.2. Test solutions

The beer was thoroughly decarbonated by pouring into a 2 L beaker, and was kept under continuous agitation with a magnetic stirrer for at least 50 min before starting the self-administration session. Fresh beer solutions were delivered daily at room temperature to the dams to avoid microorganism contamination from GD 1 throughout gestation until weaning on postnatal day 22 (PND 22). Note that dams from the MPAE and vehicle groups had limited access to beer solution, i.e. 50 mL of 10% beer (v/v) (equivalent to 4 g/kg/day), during gestation and from delivery to weaning. However, all groups had water *ad libitum*. The vehicle group received 50 mL of non-alcoholic beer (0.0% alcohol) and water *ad libitum*. The control group received water *ad libitum* as the only source of drink. A two-bottle paradigm was used with beer and water, and water was always available.

2.3. Drugs and antibodies

The ethanol administered to the animals was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and was of analytical grade.

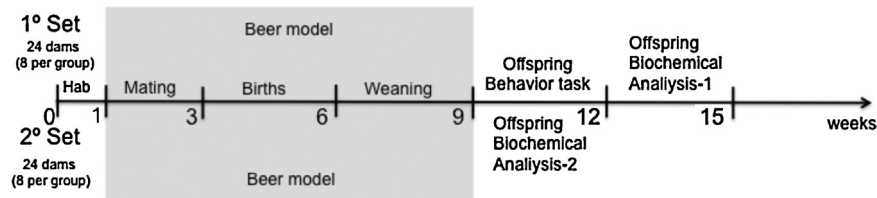


Fig. 1. Experimental design. The duration of beer treatment was between 1 and 9 weeks and each group (control, vehicle and MPAAE) started with eight dams in both sets of experiments (total of 24 dams per set). In the first set, we performed behavioral analyses (total $n = 27$ male offspring) and also the biochemical analysis, which was composed of immunohistochemistry for GFAP and NeuN in the hippocampus and quantification of S100B in the CSF. The male adolescent offspring that participated in the behavior task were not included in the biochemical analyses. In the second set, after beer treatment, we performed only biochemical analysis, which included MTT and LDH assays, quantification of the intracellular content of S100B, GFAP and NMDAR-NR1 in hippocampus tissue. The number of male offspring (n) for each of the biochemical analyses is specified in the caption of each figure.

The monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1), L-glutamate, 4-(2-hydroxyethyl), saline-HEPES, o-phenylenediamine (OPD), o-phthalaldehyde (OPA), meta-phosphoric acid, [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)] were used for biochemical analysis. Polyclonal anti-GFAP and anti-S100 antibodies were obtained from DAKO (Denmark). Peroxidase-conjugated anti-IgG and L-[2,3-³H] glutamate were obtained from Amersham (United Kingdom). The non-alcoholic “Liber®” beer (Brazil) was mixed with ethanol to prepare the beer solution to the desired concentration. This beer contains water, malt, carbohydrates, an antioxidant (INS316), a stabilizer (INS305) and hops (manufacturer’s information).

2.4. Blood ethanol levels

After weaning (PND22), we kept the dams housed individually until trunk blood samples were collected on PND23, during the dark phase. Blood ethanol levels (BEL) were determined only from dams in the MPAAE group by collecting blood following decapitation. BEL was quantified using the Sigma diagnostic kit (332UV) according to the manufacturer’s instructions. This treatment regimen resulted in an average BEL of 139.43 ± 30.04 mg/dL for the MPAAE group. The highest level reached was 178.76 mg/dL.

2.5. Plus-maze discriminative avoidance task

The adolescent male offspring were tested in a task for learning/memory–anxiety interactions performed as described by Silva and Frussa-Filho [19]. Animals from the control ($n = 9$), vehicle ($n = 8$) and MPAAE ($n = 10$) groups were tested. The task was performed in a modified elevated plus-maze made of wood and elevated 50 cm above the floor, containing two closed arms ($50 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) opposite two open arms ($50 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$). A 100-watt lamp was placed over and 80-dB noise equipment was placed under one of the closed arms as aversive stimuli. On the first day (training session), the male offspring was placed in the center of the apparatus. Over a period of 10 min, every time the offspring entered the aversive closed arm, the illumination and noise turned on, turning off when the animal left that arm. The test session was performed 24 h after the training session. In this session, the offspring was again placed in the center of the apparatus, but only for 3 min, without receiving the aversive stimuli when entering the aversive closed arm. In both sessions (training and test), the time spent in the aversive closed arm and the time spent in the non-aversive closed arm were recorded as a learning/memory parameter. Time spent in the open arms of the apparatus was also recorded in both training and test sessions. Long-term memory evaluation also compared the conditioned arm (aversive arm) and unconditioned arms (non-aversive + open arms). There were several extra-maze visual cues (door, desk, camera and observer) that

the offspring could use to distinguish the location of the different arms of the maze. All trials and parameters analyzed were recorded using Any-Maze software.

2.6. Techniques

2.6.1. Hippocampal acute slices

On PND 30, male offspring were sacrificed by decapitation and the brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄; and 10 glucose adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O₂ [69]. The hippocampi were dissected and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper®.

2.6.2. Cell integrity and metabolic viability

Cell integrity was measured by lactate dehydrogenase (LDH) activity in hippocampal slices after the stabilization period mentioned above. Determination of extracellular lactate content was carried out using a colorimetric commercial kit (Doles Ltda., Brazil) according to the manufacturer’s instructions. Cell viability was assayed using the colorimetric MTT reduction method [37]. Slices were incubated with 0.5 mg/mL of MTT at 30 °C for 30 min. The formazan product generated during incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO).

2.6.3. Tissue samples for ELISA and western blotting

Hippocampal slices were homogenized in phosphate-buffered saline at pH 7.4 (containing 1 mM EGTA and 1 mM PMSF) for S100B or GFAP ELISA. Hippocampal slices for electrophoresis/western blotting were directly homogenized in electrophoresis sample buffer at pH 6.8 (containing 62.5 mM Tris–HCl, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue) and boiled for 5 min.

2.6.4. Immunohistochemistry for GFAP and NeuN

Male offspring were anesthetized using ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, resp., i.p.) and perfused through the left cardiac ventricle using a peristaltic pump (Milan®/Brazil) with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed and left for post-fixation in the same fixative solution at 4 °C for 24 h. Subsequently, the material was cryoprotected by immersing the brain in 15% and 30% sucrose in phosphate buffer. Then, the brains were frozen by immersion in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored in a freezer (–80 °C) for later analyses. The brains were sectioned (45 μm) on a cryostat (Leitz). The free-floating sections were then incubated with polyclonal anti-GFAP from rabbit (Dako, Z0334) or nuclear neuronal marker (NeuN) from mouse (Millipore, MAB377) diluted 1:3000 in 0.4% PBS-Triton X-100 and 2% bovine serum

albumin (BSA), for 48 h at 4 °C. After washing several times with PBS, the tissue sections were incubated with Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit-IgG; green fluorescence; Invitrogen, A11008) and Alexa Fluor 568 (goat anti-mouse-IgG; red fluorescence; Invitrogen, A11004) secondary antibodies diluted 1:500 in 0.4% PBS-Triton X-100 and 2% bovine serum albumin (BSA), at room temperature for 1 h. Afterwards, the sections were washed several times and mounted on slides with Fluor Save[®] and covered with coverslips. Images were obtained with an Olympus confocal FV-1000. Pictures were analyzed using ImageJ Software 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) in accordance with Centenaro et al. [38].

2.6.5. Cerebrospinal fluid (CSF) samples

Male offspring on PND 30 were anaesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine (90 mg/kg and 15 mg/kg, respectively) and then positioned in a stereotaxic holder. CSF was collected by cisterna magna puncture using an insulin syringe (27 gauge × 1/2 in. length). A maximum volume of 30 µL was collected in a 3 min period to minimize the risk of brainstem damage. CSF was stored at –20 °C for later analysis.

2.6.6. ELISA for S100B and GFAP

ELISA for S100B was carried out as described previously [39]. Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer (pH 8.6) were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1 clone from Sigma). Polyclonal anti-S100 (from Dako) was incubated for 30 min and then a peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. ELISA for GFAP was performed as previously described [40] by coating the microtiter plate with 100 µL samples (from hippocampal slice homogenates), overnight at 4 °C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit (from DAKO) for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. The color reaction with OPD was measured at 492 nm.

2.6.7. Electrophoresis and western blotting for NMDA receptors

Protein samples (40 µg per lane) prepared for electrophoresis as described above were analyzed by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes using a semidry blotting apparatus (1.2 mA/cm²; 1 h) [41]. The membranes were blocked with 1% bovine BSA in Tris-buffered saline (TBS) (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) and then incubated for 1 h with an anti-NMDAR-NR1 antibody (NMDA receptor, NR1 subunit, all splice variants; recognizes a 103–116 kDa protein in rat brain hippocampal homogenate by immunoblot, clone R1JHL, Millipore) diluted 1:1000 in TBS containing Tween-20 and BSA. Next, membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse secondary antibody (GE Healthcare). The chemiluminescent reactions were developed using luminol as the substrate (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare) and registered on radiographic film. The immunocent of NMDA-R1 was determined as a ratio of the optical density (OD) of the protein band (NMDA-R1)/OD of the β-actin band. The bands were quantified using Scion Image[®] software.

2.6.8. Protein measurement

The total protein content was determined by the modified method of Lowry [42] using BSA as the standard.

2.6.9. Statistical analysis

Data were compared using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey post hoc test for biochemical parameters. Behavioral

Table 1
Fluid and food consumption.

	Water intake (mL)	Beer intake (mL)	Food intake (g)
<i>Average of fluids and food intake during pregnancy</i>			
Control	53.94 ± 4.16	0.00	25.33 ± 1.45
Vehicle	35.97 ± 8.19	32.35 ± 1.02	29.33 ± 0.88
MPAE	39.10 ± 2.40 [†]	27.55 ± 1.85	30.67 ± 1.45
<i>Average of fluids and food intake from delivery to weaning</i>			
Control	140.84 ± 8.79	0.00	26.49 ± 1.55
Vehicle	118.9 ± 11.14	27.34 ± 2.86	28.79 ± 5.17
MPAE	83.2 ± 20.95 [†]	42.78 ± 3.95 ^{**}	24.05 ± 1.45

Data are mean ± SEM.

[†] MPAE is different from control group, $p < 0.05$.

^{**} MPAE is different from vehicle group, $p < 0.05$.

data were analyzed using two-way-ANOVA for learning/memory and anxiety parameters and the Newman–Keuls post hoc test. GraphPad Prism 6 for OS-X was used for the statistical analysis; a probability of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Alcohol consumption

During gestation, the dams from the MPAE group consumed the beer solution at an average of 27 mL/rat/day, representing approximately 2.16 g/kg ethanol/day per rat; their average water intake was 39.1 mL/rat/day, compared to 54.0 mL/rat/day in the control rats that did not receive beer. The non-alcoholic group consumed an average of 32 mL/rat/day of non-alcoholic beer and 36 mL/rat/day of water. From delivery to weaning, the dams consumed about 43 mL/rat/day of the beer solution (MPAE group), while the consumption of non-alcoholic beer was about 27 mL/rat/day (vehicle group). Consumption of water was 83 mL/rat/day in the MPAE group, 119 mL/rat/day in the vehicle group and 141 mL/rat/day in the control group, as described in Table 1. Note that the beer solution (alcoholic and non-alcoholic) offered was limited to 50 mL/rat/day during gestation and from delivery to weaning. Moreover, there was no difference in solid food and fluid intake or even body weight gain between groups on PND22 (weaning) and on PND30 (euthanasia), as well as before that, on PND2, PND7, PND12 and PND17 (Table 2).

Table 2
Developmental data for dams and offspring.

Pregnancy outcomes variables	Prenatal treatment group		
	Control	Vehicle	MPAE
Number of pregnant dams	7	8	8
Length of gestation (days)	22.7 ± 0.4	22.9 ± 0.2	22.9 ± 0.3
Maternal death	1	0	0
<i>Dam weight (g)</i>			
Gestational day 1	202 ± 2.3	238 ± 2.4	232 ± 2.5
Gestational day 7	256 ± 4.2	260 ± 3.2	270 ± 2.9
Gestational day 14	321 ± 5.7	298 ± 4.2	304 ± 4.6
Gestational day 21	345 ± 6.4	338 ± 5.6	342 ± 5.3
Litter size	10.4 ± 0.3	11.02 ± 0.5	9.08 ± 0.7
<i>Offspring weight (g)</i>			
Postnatal day 2	7.68 ± 0.1	7.76 ± 0.2	7.78 ± 0.1
Postnatal day 7	14.33 ± 0.3	13.85 ± 0.2	14.06 ± 0.3
Postnatal day 12	21.03 ± 0.6	21.64 ± 0.4	20.90 ± 0.4
Postnatal day 17	30.5 ± 0.7	31.71 ± 0.6	32.62 ± 0.7
Postnatal day 22	39.46 ± 1.2	41.15 ± 1.5	42.35 ± 1.1

Each value represents mean ± SEM. There were no differences between groups for the weight of dams or offspring, $p > 0.05$.

3.2. Behavioral analyses

3.2.1. Learning and memory evaluation

Short- and long-term memory was analyzed considering the training and test sessions, respectively. On PND 30, male offspring from the control ($n=9$), vehicle ($n=8$) and MPAE ($n=10$) groups were trained in the PMDAT. For short-term memory (training), two-way-ANOVA was performed with treatment (control, vehicle and MPAE) as the between-subjects factor and arm type (aversive, non-aversive and open) as the within-subject factor. No significant effects of treatment were found ($F(2,69)=0.034$, $p=0.965$), but differences were detected for arm type ($F(2,69)=49.251$, $p<0.0001$) and the treatment \times arm type interaction ($F(4,69)=7.0549$, $p<0.0001$). The Newman–Keuls post hoc test showed that all groups spent less time in the aversive arm ($p<0.05$). Moreover, the analysis showed that MPAE offspring spent less time in the non-aversive arm than control offspring ($p<0.05$), but not when compared with vehicle (Fig. 2A). It is important to note that MPAE offspring spent more time in the open arms than offspring in the control group (as described in the anxiety-like behavior results). Taken together, these results suggest that all animals seemed to avoid the aversive arm during training.

In the test session, long-term memory was evaluated using the same statistical analyses; there was no significant difference for treatment ($F(2,69)=0.559$, $p=0.574$) or arm type ($F(2,69)=2.506$, $p=0.088$). On the other hand, the interaction between treatment and arm type was statistically significant ($F(4,68)=6.303$, $p=0.0002$) (Fig. 2B). The Newman–Keuls post hoc test showed that the MPAE group spent less time in the non-aversive arm when compared with the control group ($p<0.05$) and more time in the open arms when compared to both the control and vehicle groups ($p<0.05$), as described in the anxiety-like behavior results. However, all animals spent the same amount of time in the aversive arm as on the training day.

During the test session, the open arm could be interpreted as an unconditioned arm as well as a non-aversive arm. Thus, we performed a comparison between the time spent in the conditioned arm (aversive arm) and the unconditioned arms (open+non-aversive arms). As shown in Fig. 2C, two-way ANOVA revealed no treatment effect, but arm type and treatment vs. arm type interaction ($F(2,46)=0.818$, $p=0.447$; $F(1,46)=49.363$, $p<0.0001$ and $F(2,46)=3.352$, $p=0.043$, respectively) were significant. The Newman–Keuls post hoc test showed that the control and MPAE groups spent less time in the conditioned arm when compared with the unconditioned arms ($p<0.05$).

3.2.2. Anxiety-like behavior and locomotor activity evaluation

In the training session, two-way-ANOVA revealed significant a difference regarding arm type ($F(2,69)=49.251$, $p<0.0001$) and the treatment \times arm type interaction ($F(4,69)=7.0549$, $p<0.0001$). The Newman–Keuls test showed that MPAE offspring spent more time in the open arms ($p<0.05$) and less time in the non-aversive arm ($p<0.05$) than the control group, but not when compared with the vehicle group (Fig. 3A). During the test session, the same analyses showed significant treatment \times arm type interaction ($F(4,68)=6.303$, $p=0.0002$). The Newman–Keuls test showed that MPAE offspring spent more time in open arms ($p<0.05$) than both the control and vehicle groups (Fig. 3B).

Regarding locomotor activity-related parameters, no differences were found in the training ($F(2,23)=1.99$, $p>0.05$) or test session ($F(2,22)=1.08$, $p>0.05$) (data not shown).

3.3. Cell integrity and viability

Cell integrity and viability were measured with absorbance values at 560nm and 630nm for the MTT and LDH assays,

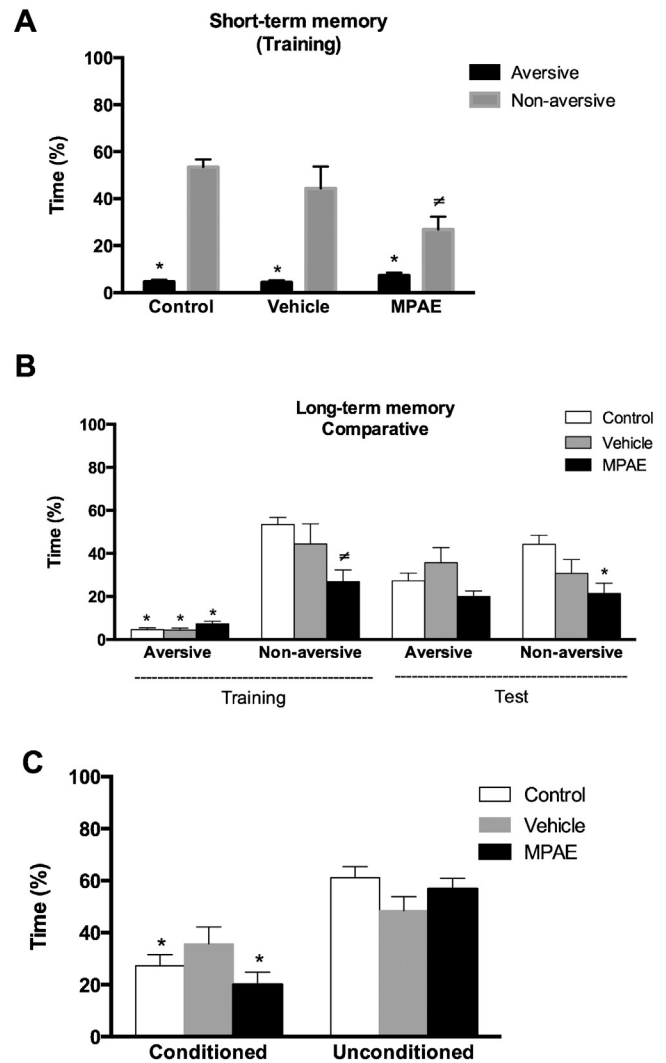


Fig. 2. PMDAT – short- and long-term memory. The effects of learning/memory on rats exposed to alcohol during gestation vs. the control and vehicle groups. Values are mean \pm SEM of percent time spent in all arms (aversive, non-aversive and open arms). Two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test ($n=7-10$). (A) Effect on short-term memory (training session). Male offspring were trained to avoid the closed aversive arm in a 10-min session. * $p<0.05$ aversive vs. non-aversive arms and $^{\#}p<0.05$ MPAE vs. control group. (B) Long-term memory. Comparison with training session, * $p<0.05$ aversive vs. non-aversive arms and $^{\#}p<0.05$ MPAE vs. control group. After 24 h, male offspring were tested in a 3-min session, in the absence of the aversive stimuli. * $p<0.05$ MPAE vs. control from the respective non-aversive arm. (C) Comparison in the test session between the time spent in the conditioned arm (aversive arm) and unconditioned arms (non-aversive + open arms). * $p<0.05$ MPAE and control groups conditioned vs. unconditioned arm.

respectively. After measurement, one-way ANOVA showed no differences between groups either for MTT ($F(3,20)=1.630$, $p=0.214$) or for LDH ($F(3,41)=1.474$, $p=0.235$), as shown in Fig. 4A and B.

3.4. Western blotting analysis

NMDA receptor (NMDAR) expression, specifically the NR1 subunit, was altered after prenatal treatment with ethanol (Fig. 5). The MPAE group showed an increase in NMDAR-NR1 expression ($F(2,15)=4.039$, $p=0.039$). The Tukey post hoc test showed that the MPAE group was different from the control group ($p<0.05$), but not from the vehicle group.

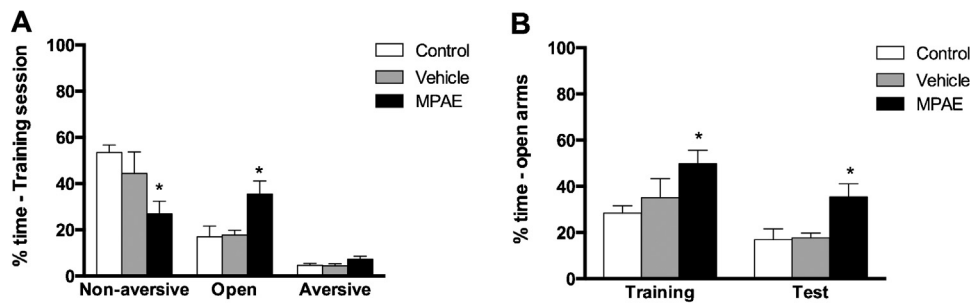


Fig. 3. PMDAT – anxiety-like behavior. Effect of the training and test sessions spent in the open arms. Values are mean \pm SEM of percent of time spent. Two-way-ANOVA followed by the Newman–Keuls test revealed the (A) effects of a 10-min training session on the time spent in all arms. * $p < 0.05$ MPAE vs. control group in the open and non-aversive arms and the (B) effect of the training and test session on time spent in the open arms. * $p < 0.05$ the MPAE group spent more time in the open arms than the control group in the training session, and in the test session, spent more time than both the vehicle and control groups in the open arms.

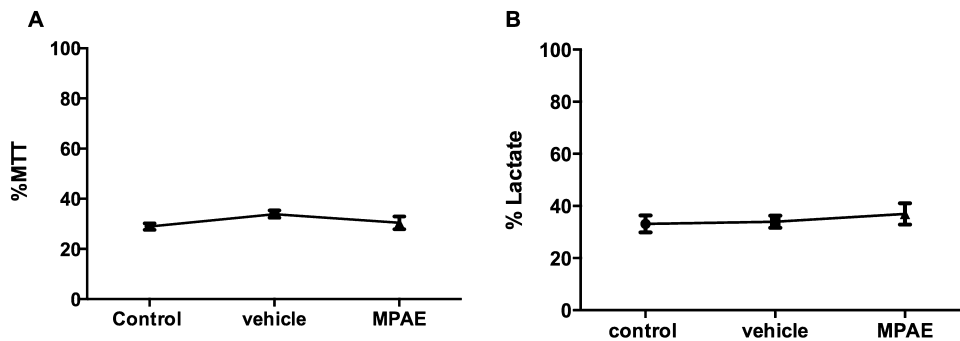


Fig. 4. Cellular integrity and metabolic viability of hippocampal slices. Cellular integrity was measured using (A) the MTT reduction assay in hippocampal slices, assuming the initial value as 100% and (B) cellular viability was measured by analyzing the lactate content in the extracellular medium expressed as percentage of the control. One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test showed no significant differences between groups ($p > 0.05$). Each value represents mean \pm SEM of five independent experiments performed in triplicate.

3.5. GFAP and S100B content

Hippocampal slices were lysed and the intracellular contents of GFAP (A) and S100B (B) were measured by ELISA. We observed a significant decrease in the GFAP content in the MPAE group, ($F(2,44) = 23.09$, $p < 0.0001$), as shown in Fig. 6A. The Tukey post hoc test revealed that the MPAE group was different from both the control and vehicle groups ($p < 0.05$). S100B, another glial protein marker, was also altered. The vehicle group showed an increase in the S100B content ($F(2,34) = 7.407$, $p < 0.0001$), and the Tukey post hoc test showed that the vehicle group was different from the other groups ($p < 0.05$) (Fig. 6B). The S100B total content in the CSF was increased in the MPAE group ($F(2,14) = 9.530$, $p = 0.0024$). The

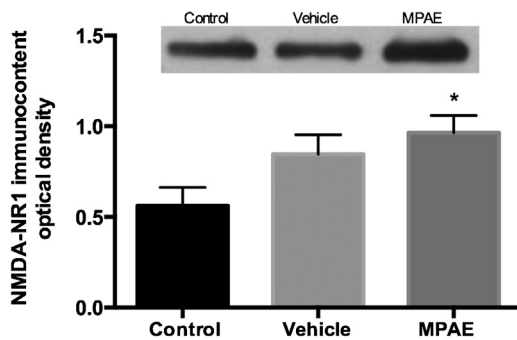


Fig. 5. Immunocontent of the NMDA-NR1 receptor. The hippocampus was dissected and homogenized for the measurement of the NMDAR-NR1 subunit by western blotting analysis. Values are mean \pm SEM of six rats per group. One-way ANOVA and the Tukey test revealed significant effects for the MPAE group, $p < 0.05$. *Significantly different.

Tukey post hoc test revealed that the MPAE group was different from both the control and vehicle groups (Fig. 7).

3.6. Immunohistochemistry for GFAP and NeuN

We assessed the hippocampus CA-1 region to evaluate GFAP protein and neuronal alterations. Immunohistochemistry was performed for GFAP protein on sections from at least five male offspring per group (Fig. 8A, D, and G; respectively, for control, vehicle and MPAE groups) and for NeuN, a protein specifically expressed in post-mitotic neurons (Fig. 8B, E and H; respectively for control, vehicle and MPAE groups). After quantification, one-way ANOVA revealed an increase in GFAP expression ($F(2,13) = 9.628$, $p = 0.0027$). The Tukey post hoc test revealed that the MPAE group was different from both the vehicle and control groups, * $p < 0.05$ (Fig. 8J). However, no variation was found for total NeuN quantification ($F(2,14) = 0.218$, $p = 0.806$) (Fig. 8K).

4. Discussion

The present investigation revealed the effects of moderate alcohol exposure during the prenatal and postnatal period on behavioral and glial parameters. Using the PMDAT, we found impairment of behavioral parameters, especially those related to anxiety, in adolescent male offspring. Moreover, significant changes in both GFAP and S100B were found following ethanol exposure. GFAP is an intermediate filament protein of the glial cytoskeleton, and moderate ethanol exposure was enough to alter its content. S100B protein is another specific astroglial marker. Changes in these proteins suggest astrocytic vulnerability of the developing brain to ethanol toxicity. Several studies have documented the effects of high concentrations of ethanol on developing

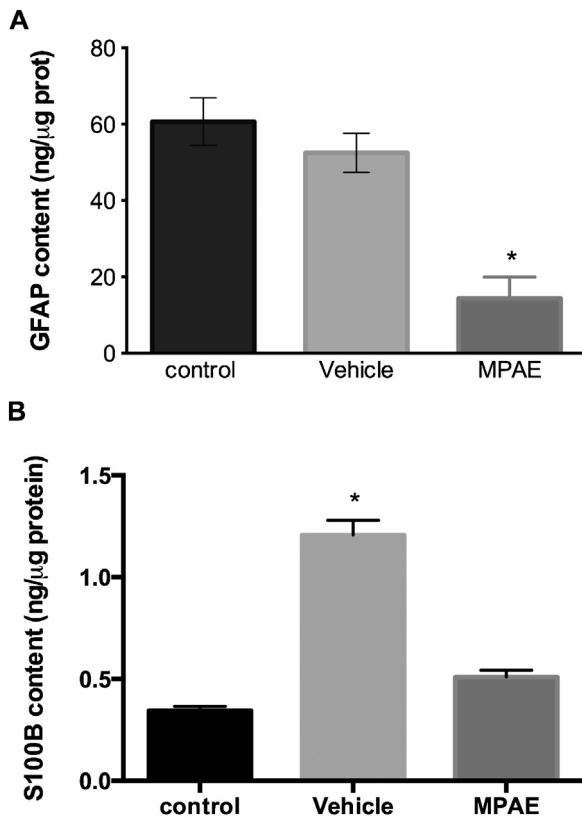


Fig. 6. Hippocampal content of GFAP and S100B. Hippocampal acute slices were lysed and homogenized and the intracellular content of GFAP and S100B was measured by ELISA. (A) GFAP. Each value is the mean \pm SEM of at least 11 independent experiments performed in triplicate. One-way ANOVA showed differences between groups, and the Tukey post hoc test revealed that the MPAE group was different from both the control and vehicle groups $*p < 0.05$. (B) S100B. Each value is the mean \pm SEM of at least nine independent experiments performed in triplicate and analyzed by one-way ANOVA. The Tukey post hoc test showed that the vehicle group was different from both the MPAE and control groups $*p < 0.05$.

neurons in the fetal brain [30,43,44], but the effects of moderate concentrations remain debatable [45].

During the behavioral task, animals were conditioned to avoid an aversive arm and choose between two closed arms (non-aversive or aversive arm) or one of the two open arms of the apparatus. During the training session, all groups were able to distinguish the aversive from non-aversive arm, suggesting that

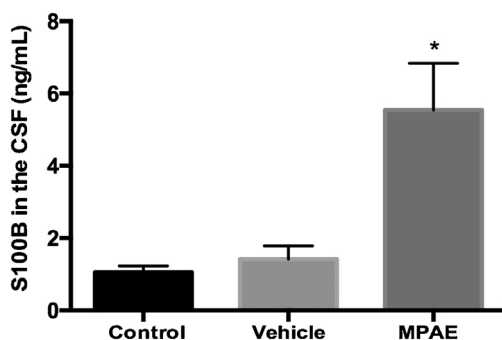


Fig. 7. S100B content in cerebrospinal fluid. The S100B content in CSF was measured by ELISA. After anesthesia, the cerebrospinal fluid was collected by magna puncture from seven male offspring per group. Each value is the mean \pm SEM. One-way ANOVA revealed differences between groups and the Tukey post hoc test showed that the MPAE group was different from both the vehicle and control groups, $*p < 0.05$.

short-term memory was preserved, since learning is indicated by a decrease in the exploration of the aversive closed arm throughout the training session [46,68]. However, in the test session, considering the conditioned (aversive) and unconditioned (non-aversive + open) arms, the MPAE and control groups seemed to retain the task, but, curiously, the vehicle group showed no difference. It is important to mention that in other studies investigating anxiety and withdrawal effects [16] or palatability for ethanol free-choice oral self-administration [15], no difference was found between the control and vehicle groups. We expected that the vehicle group would show the same performance as the control group. In addition, we also observed changes in hippocampal S100B expression in vehicle group; this will be discussed later.

The analysis of percent time spent in the open arms (currently used as a measurement of anxiety-like behavior in rodents) [19,46] showed that adolescent male offspring treated prenatally with ethanol spent more time in the open arms during both the training and test sessions when compared with the other groups, suggesting an anxiolytic-like effect. This result was seen before with the regular elevated plus maze [47], demonstrating that the enhancement of time spent in the open arms is dose-dependent. In fact, during the test session, the MPAE group, in contrast to the control and vehicle groups, spent less time in the non-aversive arm, probably because they spent more time in the open arms, suggesting that adolescent male offspring present more pronounced risk-taking behavior than those in the control and vehicle groups. Risk-taking behaviors involve reduced anxiety and fear-like behaviors, and adolescence has been linked to greater risk-taking and novelty-seeking behavior as well as a higher prevalence of drug abuse. Maternal alcohol intake during pregnancy is a risk factor for infant behavioral outcomes [48,49]. A study has suggested that hazardous drinking is more prevalent in adolescents with alcohol misusing parents vs. those whose parents do not misuse alcohol [50]. Taking these results together, we can also suggest that the learning/memory process could have been impaired by the exploratory behavior in the open arm by the MPAE group, and demonstrates the close relationship between learning/memory and anxiety [19,51]. Animal models that used either ethanol injection or a forced ethanol diet presented anxiety reduction as a predominant feature of the pharmacological profile of low to moderate doses of ethanol, in contrast with the results of ethanol withdrawal, which led to increased anxiety [16]. In our study, we found no differences in locomotor activity between groups, suggesting that moderate concentrations of alcohol during pregnancy can induce a reduction in anxiety, distinct from the sedative or euphoric alcohol effect [16,52]. However, findings can be gender specific and vary depending on the drinking outcomes under investigation. Sex differences are often seen after early environmental insults, and prenatal alcohol exposure is no exception. According to the literature, spatial learning impairment is different for each gender [53], and the behavior in the elevated plus maze may be different for males and females [54]. In order to avoid a confounder (gender), we used only male offspring for all analyses.

It is well known that prenatal ethanol exposure affects NMDA receptor sites in the brain, and these alterations during brain ontogeny may underlie some of the learning and memory deficits observed following fetal alcohol exposure [55]. NMDAR are crucial for the induction of long-term synaptic plasticity [56], and the NMDAR-NR1 subunit has been previously associated with chronic ethanol exposure [57]. In the present study, we found up-regulation of the NR1 subunit in the MPAE group, which has been reported before [58] as a compensatory response to prolonged NMDAR inhibition in utero that persists into adolescence and adulthood in the absence of postpartum alcohol exposure; this has also been associated with an increase in the number of NMDAR sites in brain

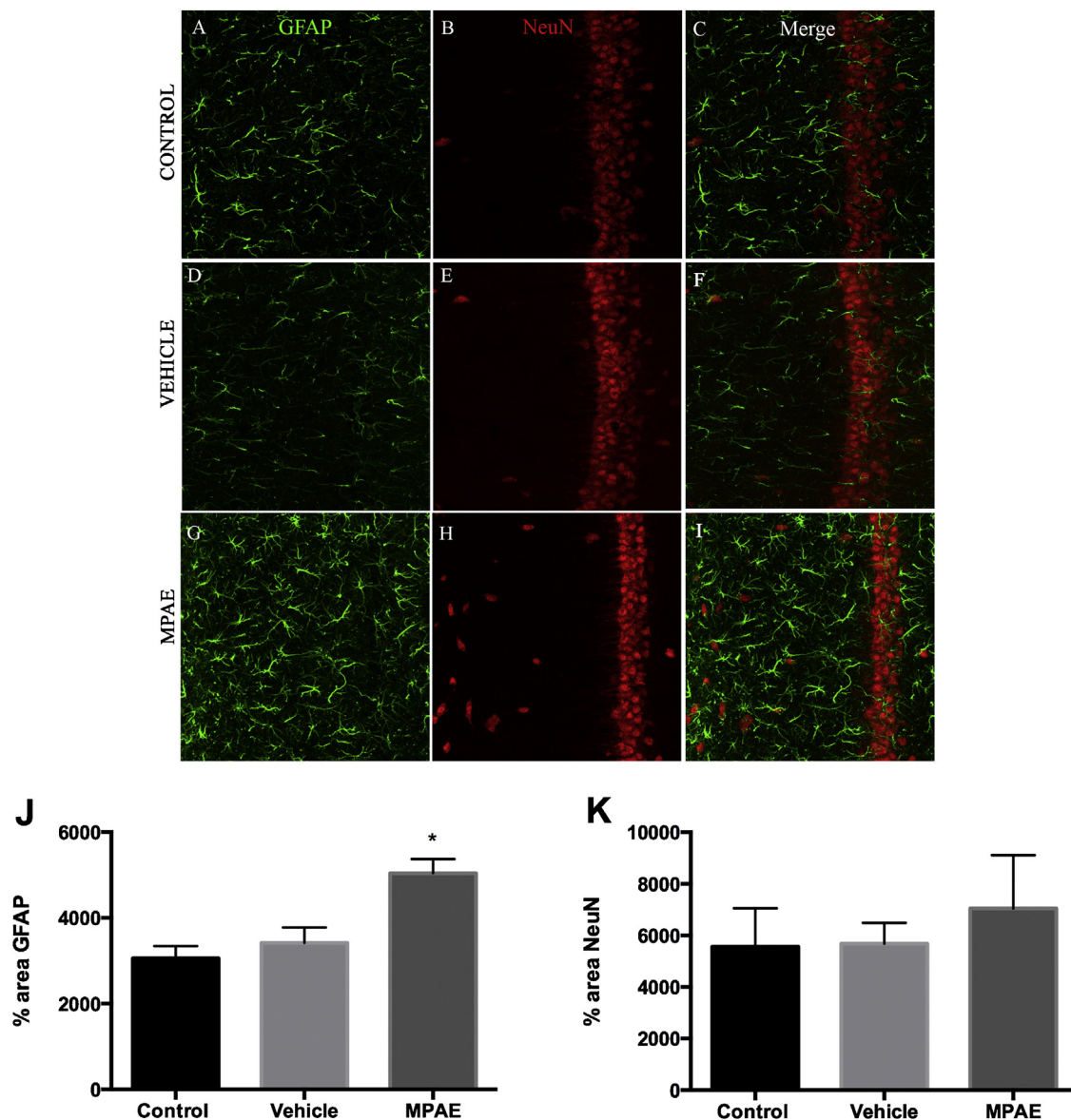


Fig. 8. GFAP and NeuN immunohistochemistry. Qualitative data of CA-1 hippocampal region immunofluorescence from control ($n=5$), vehicle ($n=6$) and MPAE ($n=5$) groups are shown. 40 \times magnification for GFAP (A – control, D – vehicle and G – MPAE, first column), NeuN (B – control, E – vehicle and H – MPAE, second column) and double-stained for GFAP and NeuN (C – control, F – vehicle and I – MAE, third column). One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test showed the quantification of image data for GFAP in MPAE group was different from both the vehicle and control groups, but no differences were found for NeuN in the hippocampal CA-1 region as shown, respectively, in letters J and K. Values represent mean \pm SEM of the percentage of GFAP or NeuN area, with * $p < 0.05$.

tissue [59]. NMDAR expression and function can seriously impact neurodevelopment in the hippocampus [58]. Moreover, astrocytes have been shown to be important in regulating the degree of activation of NMDAR on synaptic plasticity [60]. The NR1 subunit was analyzed by taking into account the link between this subunit and previous studies on prenatal alcohol exposure [29,57]. However, it is also important to emphasize that the NMDAR-NR2A and NR2B subunits are highly expressed forms in the adult rodent hippocampus and would be important to investigate in further studies.

Over the past few years, several studies have validated the idea that many of the synapses in the CNS are tripartite in nature. Disruption of astrocytic supportive functions has the potential to disrupt synaptic transmission, synaptic plasticity and neuronal excitability [60]. Astrocytes are the primary targets of chemical injuries in the CNS, and GFAP can be used as a specific marker for the

astrocyte response to ethanol-induced injury as well as to examine astrocyte proliferation and hypertrophy in response to injury [61,62]. The considerable decrease in the GFAP immunofluorescence seen in hippocampal tissue after prenatal ethanol treatment found by ELISA is consistent with the literature [63] showing the vulnerability of astrocytes to ethanol during development. However, the hippocampal CA1 region showed an increase in this protein in the MPAE group, consistent with previous studies [61,62]. Experimental evidence shows that the effects of ethanol on the developing brain are not uniform; some regions are more affected than others [52]. Moreover, within the same brain structure, different results have been found for different specific regions [45]. The regional differences in the glial response to ethanol with respect to GFAP may reflect the stage-dependent vulnerability of astrocytes (different brain regions perform specific developmental functions asynchronously). However, the apparent discrepancy observed in

this study between decreased GFAP expression in the hippocampus (measured by ELISA) and an increase in the CA1 region (measured by immunohistochemistry) would demand specific analysis of other hippocampal areas in further studies.

Toward the final stage of neuronal differentiation, cells begin to express proteins typically presented in mature neurons such as NeuN; the results of the current study suggest that exposure to ethanol under this experimental protocol did not alter the total number of mature neurons, leading us to focus on glial impairment. Furthermore, GFAP is a target of S100B, and this study showed an increase in the S100B content in the CSF following prenatal ethanol treatment. An increase in S100B may be a marker of impairment, but may also reflect an attempt to save and protect cell regions that have been damaged by alcohol, as a response to astrocyte toxicity [64]. However, interestingly, we observed an increase in the hippocampal S100B content, but not in GFAP, in the vehicle group. An increase in S100B (and GFAP) induced by restraint prenatal stress [65] has been described. However, it is unlikely that our beer model (that does not involve mobility restriction or gavage) was stressing to dams. Moreover, it would be possible to conceive that the caloric content or some component of the vehicle caused this change in S100B protein expression. In fact, it has been reported that a high calorie diet during lactation can change serotonergic transmission [66], which in turn could regulate S100B expression [67]. However, the amount of beer vehicle offered was limited, and no significant body weight changes were observed in the dams. Therefore, at this moment, the biochemical significance of this increase in S100B expression in offspring rats in the vehicle group is unclear. Regardless, ethanol exposure during pregnancy caused a decrease in hippocampal GFAP and prevented the increase in S100B observed in the vehicle group. Indeed, the effect of non-alcoholic beer on behavior and neurochemical analyses needs careful investigation in further studies.

5. Conclusion

The fact that the brain passes through several developmental stages and is particularly vulnerable to toxic agents means that the threshold dose of alcohol capable of producing detrimental effects is likely to vary according to the alcohol dose and the stage of development. A very important finding of the present investigation is that moderate prenatal ethanol exposure produced effects on both behavioral and glial parameters. The reduction in anxiety in adolescent male offspring treated prenatally with ethanol suggests that these rats demonstrate more pronounced risk-taking behavior that could also interfere in decision making in risky situations. We showed that even a moderate prenatal ethanol dose is sufficient to evoke an astroglial response, presenting alterations in both GFAP (structural) and S100B (functional) expression. Progress in understanding the effects of ethanol and the mechanisms involved may provide the basis for effective therapeutic interventions. Understanding how prenatal ethanol exposure produces biochemical and behavioral deficits is of great economic and medical importance, leading to better interventions in response to ethanol toxicity. Indeed, it is better to avoid alcohol exposure during gestation, since even moderate doses may affect different parameters in the CNS. Healthcare professionals must be aware of the impact of ethanol exposure during pregnancy and the resulting impairment.

Acknowledgments

We would like to thank Fernanda M. Lopes, Ana Paula Herrmann and Daniela F. de Souza for their scientific contribution and Patrícia Sesterheim and her group for their technical assistance in the animal house. This study was supported by the Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection (573677/2008-5).

References

- [1] Murphy DJ, Mullally A, Cleary BJ, Fahey T, Barry J. Behavioural change in relation to alcohol exposure in early pregnancy and impact on perinatal outcomes – a prospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013;13:8.
- [2] Edwards EM, Werler MM. Alcohol consumption and time to recognition of pregnancy. *Matern Child Health J* 2006;10(6):467–72.
- [3] Mullally A, Cleary BJ, Barry J, Fahey TP, Murphy DJ. Prevalence, predictors and perinatal outcomes of peri-conceptional alcohol exposure – retrospective cohort study in an urban obstetric population in Ireland. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11:27.
- [4] O'Leary CM, Nassar N, Kurinczuk JJ, Bower C. The effect of maternal alcohol consumption on fetal growth and preterm birth. *BJOG Int J Obstet Gynecol* 2009;116(3):390–400.
- [5] Ceccanti M, Alessandra Spagnolo P, Tarani L, Luisa Attilia M, Chessa L, Mancinelli R, et al. Clinical delineation of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) in Italian children: comparison and contrast with other racial/ethnic groups and implications for diagnosis and prevention. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31(2):270–7.
- [6] Hutson JR, Magri R, Gareri JN, Koren G. The incidence of prenatal alcohol exposure in Montevideo Uruguay as determined by meconium analysis. *Ther Drug Monit* 2010;32(3):311–7.
- [7] Medina AE. Fetal alcohol spectrum disorders and abnormal neuronal plasticity. *Neuroscientist* 2011;17(3):274–87.
- [8] Henderson J, Gray R, Brocklehurst P. Systematic review of effects of low-moderate prenatal alcohol exposure on pregnancy outcome. *BJOG Int J Obstet Gynecol* 2007;114(3):243–52.
- [9] Hamilton DA, Akers KG, Rice JP, Johnson TE, Candelaria-Cook FT, Maes LL, et al. 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. *Behav Brain Res* 2010;207:290–304.
- [10] Dobson CC, Mongillo DL, Poklewska-Kozielec M, Winterborn A, Brien JF, Reynolds JN. Sensitivity of modified Biel-maze task, compared with Y-maze task, to measure spatial learning and memory deficits of ethanol teratogenicity in the guinea pig. *Behav Brain Res* 2012;233(1):162–8.
- [11] Sood B, Delaney-Black V, Covington C, Nordstrom-Klee B, Ager J, Templin T, et al. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years: I. Dose–response effect. *Pediatrics* 2001;108(2):E34.
- [12] Guerri C. Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotox Res* 2002;4(4):327–35.
- [13] Tiwari V, Chopra K. Attenuation of oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis by curcumin prevents cognitive deficits in rats postnatally exposed to ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 2012;224(4):519–35.
- [14] Iwaniec UT, Turner RT. Intraperitoneal injection of ethanol results in drastic changes in bone metabolism not observed when ethanol is administered by oral gavage. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37(8):1271–7.
- [15] Hargreaves GA, Wang EY, Lawrence AJ, McGregor IS. Beer promotes high levels of alcohol intake in adolescent and adult alcohol-preferring rats. *Alcohol* 2011;45(5):485–98.
- [16] Gallate JE, Morley KC, Ambermoon P, McGregor IS. The consequences of beer consumption in rats: acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;166(1):51–60.
- [17] Samson HH, Denning C, Chappelle AM. The use of nonalcoholic beer as the vehicle for ethanol consumption in rats. *Alcohol* 1996;13(4):365–8.
- [18] Silva RH, Bellot RG, Vital MA, Frussa-Filho R. Effects of long-term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;129(4):322–8.
- [19] Silva RH, Frussa-Filho R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions: effects of chlordiazepoxide and caffeine. *J Neurosci Methods* 2000;102(2):117–25.
- [20] Claro FT, Silva RH, Frussa-Filho R. Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine-induced amnesia. *Physiol Behav* 1999;67(4):551–4.
- [21] Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979;3(1):79–83.
- [22] Nixon K, Hughes PD, Amsel A, Leslie SW. NMDA receptor subunit expression after combined prenatal and postnatal exposure to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28(1):105–12.
- [23] Mooney SM, Varlinskaya EI. Acute prenatal exposure to ethanol and social behavior: effects of age, sex, and timing of exposure. *Behav Brain Res* 2011;216(1):358–64.
- [24] Kane CJM, Smith SM, Miranda RC, Kable J. Proceedings of the 2010 annual meeting of the Fetal Alcohol Spectrum Disorders Study Group. *Alcohol* 2012;46(1):107–14.
- [25] Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function. *Ann Med* 1990;22(4):247–52.
- [26] Swartzwelder HS, Wilson WA, Tayyeb MI. Differential sensitivity of NMDA receptor-mediated synaptic potentials to ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19(2):320–3.

- [27] Criado JR, Ehlers CL. Effects of adolescent ethanol exposure on event-related oscillations (EROs) in the hippocampus of adult rats. *Behav Brain Res* 2010;210(2):164–70.
- [28] Costa ET, Savage DD, Valenzuela CF. A review of the effects of prenatal or early postnatal ethanol exposure on brain ligand-gated ion channels. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:706–15.
- [29] Naassila M, Daoust M. Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on the developmental profile of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *J Neurochem* 2002;80:850–60.
- [30] Berman RF, Hannigan JH. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus* 2000;10(1):94–110.
- [31] Ervard SG, Vega MD, Ramos AJ, Tagliaferro P, Brusco A. Altered neuron-glia interactions in a low, chronic prenatal ethanol exposure. *Brain Res Dev Brain Res* 2003;147(1–2):119–33.
- [32] Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, et al. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26(1):81–6.
- [33] Ervard SG, Duhalde-Vega M, Tagliaferro P, Mirochnic S, Caltana LR, Brusco A. A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fully recovered even after a long abstinence: an immunohistochemical study. *Exp Neurol* 2006;200(2):438–59.
- [34] Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, et al. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(12):5359–63.
- [35] Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003;60(6):540–51.
- [36] Brin T, Borucki K, Ambrosch A. The influence of experimental alcohol load and alcohol intoxication on S100B concentrations. *Shock* 2011;36(4):356–60.
- [37] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119(2):203–10.
- [38] Centenaro LA, Jaeger MdaC, Ilha J, de Souza MA, Kalil-Gaspar PI, et al. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: effects on functional recovery and axonal regeneration. *Brain Res* 2011;1426:54–72.
- [39] Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. *Neurosci Methods* 2008;169(1):93–9.
- [40] Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 2007;162(1–2):282–6.
- [41] Karl J, Gottfried C, Tramontina F, Dunkley P, Rodnight R, Gonçalves CA. GFAP phosphorylation studied in digitonin-permeabilized astrocytes: standardization of conditions. *Brain Res* 2000;853(1):32–40.
- [42] Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977;83(2):346–56.
- [43] Livy DJ, Miller EK, Maier SE, West JR. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. *Neurotoxicol Teratol* 2003;25(4):447–58.
- [44] Gil-Mohapel J, Boehme F, Kainer L, Christie BR. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: insights from different rodent models. *Brain Res Rev* 2010;64(2):283–303.
- [45] Valenzuela CF, Morton RA, Diaz MR, Topper L. Does moderate drinking harm the fetal brain: insights from animal models. *Trends Neurosci* 2012;35(5):284–92.
- [46] Patti CL, Kameda SR, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Lopez GB, Niigaki ST, et al. Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;184:1–12.
- [47] Carneiro LM, Diógenes JP, Vasconcelos SM, Aragão GF, Noronha EC, Gomes PB, et al. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 2005;27(4):585–92.
- [48] Chen JH. Maternal alcohol use during pregnancy, birth weight and early behavioral outcomes. *Alcohol Alcohol* 2012;47(6):649–56.
- [49] Cortese BM, Mitchell TR, Galloway MP, Prevost KE, Fang J, Moore GJ, et al. Region-specific alteration in brain glutamate: possible relationship to risk-taking behavior. *Physiol Behav* 2010;99(4):445–50.
- [50] Haugland HS, Holmen LT, Ravndal E, Bratberg HG. Parental alcohol misuse and hazardous drinking among offspring in a general teenage population: gender-specific findings from the Young-HUNT 3-study. *BMC Public Health* 2013;13:1140.
- [51] Sanday L, Patti CL, Zanin KA, Fernandes-Santos L, Oliveira LC, Kameda SR, et al. Ethanol-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37(1):30–9.
- [52] Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, et al. Effect of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:998–1040.
- [53] Goodlett CR, Peterson SD. Sex differences in vulnerability to developmental spatial learning deficits induced by limited binge alcohol exposure in neonatal rats. *Neurobiol Learn Mem* 1995;64(3):265–75.
- [54] Osborn JA, Kim CK, Steiger J, Weinberg J. Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22(3):685–96.
- [55] Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48(1):19–47.
- [56] Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 1983;334:33–46.
- [57] Ron D. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist* 2004;10(4):325–36.
- [58] Melendez RI, Hicks MP, Cagle SS, Kalivas PW. Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(3):326–33.
- [59] Hargreaves GA, Quinn H, Kashem MA, Matsumoto I, McGregor IS. Proteomic analysis demonstrates adolescent vulnerability to lasting hippocampal changes following chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33(1):86–94.
- [60] Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 2007;13(2):54–63.
- [61] Franke H, Kittner H, Berger P, Wirkner K, Schramek J. The reaction of astrocytes and neurons in the hippocampus of adult rats during chronic ethanol treatment and correlations to behavioral impairments. *Alcohol* 1997;14(5):445–54.
- [62] Dalçık H, Yardimoglu M, Filiz S, Gonca S, Dalçık C, Erden BF. Chronic ethanol-induced glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity: an immunocytochemical observation in various regions of adult rat brain. *Int J Neurosci* 2009;119(9):1303–18.
- [63] Vallés S, Sancho-Tello M, Miñana R, Climent E, Renau-Piqueras J, Guerri C. Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. *J Neurochem* 1996;67(6):2425–33.
- [64] Kleindienst A, Harvey HB, Rice AC, Müller C, Hamm RJ, Gaab MR, et al. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat. *J Neurotrauma* 2004;21(5):541–7.
- [65] Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC. Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 2006;83(5):787–800.
- [66] Wright TM, Fone KC, Langley-Evans SC, Voigt JP. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci* 2011;29(8):785–93.
- [67] Bock N, Koc E, Alter H, Roessner V, Becker A, Rothenberger A, et al. Chronic fluoxetine treatment changes S100B expression during postnatal rat brain development. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2013;23(7):481–9.
- [68] Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(1):45–54.
- [69] Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, Almeida LMV, Leite MC, Thomazi AP, et al. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca²⁺ and K⁺. *Neurochem Res* 2009;34(9):1603–11.

Parte III

3 Discussão

Várias pesquisas apontam os efeitos tóxicos do etanol administrado durante o período pré-natal, após a exposição aguda do tipo *binge*, principalmente na infância e na adolescência enquanto o SNC ainda está no processo de desenvolvimento (Abel, 1984; Streissguth et al., 1991; Livy et al., 2003). Por outro lado, existem trabalhos mostrando efeitos benéficos da ingestão crônica de cerveja e outras bebidas alcoólicas sob doses moderadas na prevenção de doenças cardíacas (Krenz & Korthuis, 2012; Kondo, 2004). No entanto, ainda existem poucas evidências que mostram os efeitos do etanol durante o período gestacional sob doses moderadas e administradas de forma crônica, com o intuito de investigar se o “beber social” é capaz de impactar no desenvolvimento do SNC do feto. O presente trabalho mostrou os efeitos da exposição pré e pós-natal ao etanol em parâmetros gliais no hipocampo de ratos machos na fase da adolescência (PND 30). Além disso, investigou se o comportamento do tipo ansiedade, o aprendizado e a memória poderiam ser afetados, mesmo sob doses moderadas, visto que estudos com exposição aguda e concentração de álcool no sangue (CAS) > 200 mg/dl (Valenzuela et al., 2012) relatam diminuição da ansiedade e déficit de memória e aprendizagem após tratamento crônico com etanol (Sanday et al., 2013; Bammer & Chesher, 1982; Berry & Matthews, 2004).

A cerveja é a bebida alcoólica mais comum no mundo, representando 40% de todo etanol consumido (World Health Organization, 2004). Portanto, a validade epidemiológica de utilizar a cerveja num modelo animal é uma vantagem (McGregor & Gallate, 2004). Roedores apresentam um apetite e

preferência considerável para cerveja, ingerindo voluntariamente quantidades muito maiores de cerveja do que etanol na água (McGregor et al., 1999). A preferência por cerveja por linhagens não selecionadas, como Wistar, garantiu que os animais atingissem CAS consideráveis.

O modelo animal de exposição ao etanol utilizando a cerveja sem álcool como veículo da solução tem sido utilizado por diferentes pesquisadores e tem demonstrado unanimidade quanto às suas vantagens (Lancaster & Spiegel, 1989; Lancaster & Spiegel, 1992; Garth A Hargreaves et al., 2009). O modelo de autoadministração evitou o estresse da administração forçada (gavagem e injeção intraperitoneal) e as alterações que podem acontecer tanto no SNC (Eravci et al., 1999) quanto nos níveis de dependência do etanol pelo animal (Tolliver & Samson, 1991). Dessa forma, na autoadministração crônica, o animal consome a solução ao longo das 24h do dia mantendo a CAS contante, mas não alta. (Samson et al., 1996; Hargreaves et al., 2011). O presente trabalho foi o primeiro a utilizar o modelo de cerveja sem álcool administrando doses moderadas durante o período gestacional até o desmame dos filhotes e a avaliar parâmetros neurogliais na adolescência. O objetivo de seguir o tratamento durante o período da amamentação foi abranger as principais janelas do desenvolvimento do SNC dos animais filhotes. Durante a gestação, as ratas do grupo MPAE consumiram, em média, 27 ml/rata/dia, representando aproximadamente 2.16 g/kg etanol/dia, resultando em média de CAS de 139.43 ± 30.04 mg/dl. Durante a lactação, o consumo de cerveja aumentou para 43 ml/rata/dia. A manutenção do controle da ingesta diária limitada em no máximo 50 mL de solução alcoólica/24h foi fundamental para manter a CAS sob níveis

moderados, principalmente durante o período de lactação quando as fêmeas tendem a ingerir maiores quantidades de líquidos. Um estudo mostrou que quando é permitido o consumo ilimitado de cerveja, o animal é capaz de ingerir cerca de 12 g/kg etanol/dia (Tolliver & Samson, 1991), o que seria equivalente a, aproximadamente, 150 mL de cerveja com teor alcoólico 10% (cerveja pilsen comum) em que certamente atingiria CAS > 200 mg/dl, similares às CAS observadas em modelos animais de SAF (Abel, 1984).

O controle da ingesta nutricional adequada da mãe é igualmente importante para que não seja um fator confundidor do estudo, uma vez que bebidas alcoólicas em excesso podem interferir metabolicamente e levar a desidratação e perda de peso tanto da mãe quanto do feto (Wiener et al., 1981; Dreosti, 1993; Weinberg et al., 1990). Conforme esperado, não foram observadas alterações significativas no peso dos filhotes, mostrando que a dose utilizada realmente pode ser considerada moderada, uma vez que cumpriu o objetivo de não interferir no peso dos filhotes neonatos e também por manter uma CAS nas ratas mães abaixo da concentração prevista na SAF (Valenzuela et al., 2012).

Considerando prejuízos cognitivos relacionados a doses moderadas de álcool, um estudo com roedores mostrou que a ingestão moderada de etanol no período pré-natal levou a prejuízos no aprendizado e memória dependente do hipocampo nos filhotes que realizaram as tarefas de medo condicionado ao contexto e do labirinto aquático de Morris (Savage et al., 2002). Esse mesmo grupo de pesquisadores revelou ainda que ratos expostos ao etanol apresentavam redução na liberação do glutamato no hipocampo, sugerindo que

as alterações comportamentais observadas poderiam ser devido a um déficit no sistema glutamatérgico (Savage et al., 2010).

A tarefa da esQUIVA discriminativa passiva (PMDAT) utilizada neste trabalho procurou identificar nos filhotes adolescentes machos a ocorrência de prejuízo no processo de aprendizado/memória e no comportamento do tipo ansiedade após a exposição moderada de etanol durante o período pré-natal.

No primeiro dia da tarefa (sessão de treino), os animais foram condicionados a evitar um braço fechado-aversivo, podendo escolher entre os braços abertos ou um braço fechado não-aversivo. No segundo dia (sessão de teste), foram reexpostos ao mesmo aparato, mas na ausência do estímulo aversivo. Durante a sessão de treino todos os grupos foram capazes de distinguir entre o braço aversivo e não-aversivo, sugerindo que a memória de curta duração não foi afetada, uma vez que o aprendizado é indicado pela diminuição da exploração do braço fechado aversivo. Durante a sessão de teste, considerando os braços condicionado (braço fechado aversivo) e não-condicionado (braço aberto + braço fechado não-aversivo), os grupos controle e MPAAE parecem ter aprendido a tarefa, gastando mais tempo nos braços não-condicionado. No entanto, curiosamente, o grupo veículo pareceu não ter aprendido, uma vez que não mostrou diferença significativa de permanência entre esses braços. Esperava-se que o grupo veículo acompanhasse o resultado do grupo controle, mostrando diferença significativa em relação ao grupo MPAAE. É importante lembrar que o grupo veículo ingeriu cerveja sem álcool durante a gestação em quantidades limitadas. Outros estudos utilizando o modelo de exposição ao etanol através da cerveja sem álcool não encontraram diferenças

comportamentais entre o grupo veículo e o grupo tratado (Gallate et al., 2003; McGregor & Gallate, 2004), embora o tratamento não tenha sido pré-natal.

No entanto, quando analisamos o parâmetro ansiedade, observamos que o grupo MPAAE permaneceu mais tempo nos braços abertos tanto no treino quanto no teste quando comparado aos demais grupos. E ainda, este grupo permaneceu menos tempo no braço não-aversivo que os demais grupos, provavelmente porque gastou mais tempo nos braços abertos, sugerindo que o tratamento pré-natal causou um efeito do tipo ansiolítico nesses animais. Uma vez que a tendência do rato é de evitar espaços abertos, filhotes adolescentes expostos ao etanol no período pré-natal apresentaram maior comportamento de risco que os grupos não expostos. O comportamento de risco envolve redução de ansiedade e medo, comportamentos geralmente presentes durante a fase da adolescência (Chen, 2012; Cortese et al., 2010), na qual o córtex pré-frontal, responsável pelas funções executivas, ainda mostra-se em desenvolvimento e mais vulnerável a impulsividade, a decisões inconsequentes e comportamentos de risco (Koob & Volkow, 2010).

Utilizando esta tarefa nós também avaliamos a atividade locomotora dos animais, contabilizando a distância percorrida durante cada sessão, no entanto não encontramos diferença significativa entre os grupos, sugerindo que essa dose moderada de etanol foi capaz de reduzir a ansiedade de forma distinta dos efeitos sedativo e eufórico do etanol. Juntos, esses resultados comportamentais mostram a íntima correlação do processo de aprendizagem/memória e ansiedade, mostrando que o fato do grupo MPAAE ter gastado mais tempo no braço aberto que no braço não-aversivo pode ter sido pelo correto aprendizado da tarefa ou pela interferência da redução da ansiedade; isto é, ou ele realmente

aprendeu a tarefa ou o aprendizado foi afetado pelo aumento do comportamento exploratório no braço aberto devido à redução da ansiedade.

É importante ressaltar que os resultados obtidos são sexo, idade e dose dependentes, ou seja, neste estudo foram utilizados somente ratos adolescentes machos expostos a doses moderadas de etanol durante a gestação, pois tanto o comportamento de aprendizagem (Goodlett & Peterson, 1995) como de ansiedade podem variar entre machos e fêmeas (J.A. Osborn et al., 1998), assim como a questão hormonal que pode interferir e levar a diferenças entre os sexos (Lancaster et al., 1996).

Sabe-se que o processo de aprendizagem/memória e também a ansiedade estão associados ao funcionamento do sistema glutamatérgico (Savage et al., 2010). A exposição aguda e crônica ao etanol aumenta a liberação de glutamato sináptico e inibe os receptores do tipo NMDA (Chefer et al., 2011). Entretanto, a exposição pré-natal ao etanol pode alterar a expressão dos receptores NMDA (NMDAR) durante o desenvolvimento, o que pode ser uma das causas do déficit no processo de aprendizado e memória (Alfonso-Loeches & Guerri, 2011), uma vez que esses receptores são cruciais no processo de indução da plasticidade sináptica (Savage et al., 2002; Steullet et al., 2006). Os NMDAR tem sido associados a diferentes fases associadas ao abuso de álcool, incluindo a abstinência, a fissura, a recaída, o desenvolvimento de tolerância e de dependência (Kumari & Ticku, 2000). Em nossos resultados, as fatias hipocâmpais de ratos adolescentes previamente expostos ao etanol no período gestacional revelaram um aumento da expressão dos NMDAR, especificamente para a subunidade NR1, subunidade previamente associada com exposição crônica ao etanol (Ron, 2004). Esse aumento na expressão dos receptores NMDA

já foi reportado anteriormente como uma resposta compensatória e neuroadaptativa à prolongada inibição dos mesmos durante a exposição ao etanol no período gestacional (Lovinger et al., 1990; Helfer et al., 2014). Já foi mostrado que este aumento pode persistir durante a adolescência até a vida adulta na ausência do etanol (Garth A. Hargreaves et al., 2009). Investigamos os efeitos na subunidade NR1 devido a resultados anteriores que demonstraram alteração no mRNA dessa subunidade após a exposição pré-natal (Naassila & Daoust, 2002); mas as subunidades NR2A and NR2B também são importantes e merecem ser investigadas futuramente, uma vez que estão associadas à indução da memória de longa duração (Tang et al., 1999). É importante ressaltar que o etanol é capaz de alterar a função e expressão dos NMDAR de forma distinta em diferentes regiões cerebrais alterando a composição das subunidades desse canal (Ron, 2004).

Em modelos animais foi observado que a liberação e a captação do glutamato podem variar conforme o padrão de consumo de álcool. Já foi mostrado que a exposição crônica ao etanol, mesmo sob doses moderadas, aumenta a liberação de glutamato no hipocampo, mas não necessariamente altera a captação do glutamato extracelular (Chefer et al., 2011). Por outro lado, o tratamento agudo com etanol mostrou aumento da captação de glutamato (Möykkynen & Korpi, 2012). O presente trabalho agrega a evidência de que a exposição pré-natal ao etanol, sob doses moderadas, diminui a captação de glutamato no hipocampo dos filhotes no período da adolescência, sugerindo uma maior vulnerabilidade do sistema glutamatérgico hipocampal durante o desenvolvimento após tratamento pré-natal com etanol. O efeito ansiolítico observado no comportamento dos animais do grupo MPAE poderia estar, em

parte, associado ao efeito da diminuição da captação de glutamato, uma vez que já foi mostrado que algumas substâncias, como a clozapina e alstonina (antipsicóticos), diminuem a captação do glutamato e apresentam comprovados efeitos ansiolíticos (Herrmann et al., 2012).

A fim de investigar com maiores detalhes a diminuição da captação de glutamato, nós quantificamos o conteúdo hipocampal dos principais transportadores glutamatérgicos, EAAT 1 (GLAST) e EAAT 2 (GLT-1), expressos em astrócitos no SNC e que controlam os níveis de glutamato extracelular (Levy et al., 1998). Estudos mostram que a exposição aguda sob altas doses de etanol causa não só o aumento da expressão desses transportadores, mas também um aumento na captação de glutamato (Zink et al., 2011; Shigeri et al., 2004). No entanto, durante a abstinência parece haver uma diminuição na expressão dos transportadores (Abulseoud et al., 2014).

Os nossos dados revelaram que a administração pré-natal sob doses moderadas de etanol ocasionou uma redução na expressão dos transportadores EAAT 1, no grupo MPAAE, sugerindo que esta diminuição pode estar associada a diminuição da captação de glutamato. Entretanto, observamos um aumento da expressão dos transportadores EAAT 2 para este mesmo grupo. Similarmente, Melendez e colaboradores mostraram que a administração crônica (sete dias) de etanol sob dose moderada levou a uma diminuição na captação de glutamato no núcleo accumbens, mas não na expressão dos transportadores glutamatérgicos gliais, sugerindo que o fato de alterar a captação de glutamato, não está, necessariamente, associado a alterações no conteúdo dos transportadores (Melendez et al., 2005). Ressaltamos ainda que o resultado do aumento da expressão do transportador EAAT 2 revelado pela técnica de eletroforese revela

um aumento no conteúdo total do tecido hipocampal e não um aumento específico do transportador na membrana celular. Além disso, existem diferentes fatores metodológicos que podem levar a variações nesses resultados, incluindo diferenças na região cerebral estudada e o tipo de modelo animal utilizado. Estudos sobre a expressão gênica que demonstrem a viabilidade funcional ou de modificações pós-translacionais desses transportadores na membrana são necessários para obtenção de resultados conclusivos.

Os efeitos do etanol podem variar de acordo com a dose administrada. A fim de testar a hipótese de que a redução na captação de glutamato encontrada no grupo MPAGE estaria associada à dose administrada, realizamos um tratamento *in vitro* com fatias hipocampais de ratos naïve e comparamos com as fatias hipocampais dos filhotes do grupo MPAGE. Aplicamos diferentes doses de etanol (exposição aguda a 5 mM, 50mM e 500mM) e avaliamos a captação de glutamato. Observamos uma diminuição significativa da captação de glutamato nas fatias dos ratos naïve apenas na dose mais alta (500 mM) de etanol. No entanto, no grupo MPAGE a captação de glutamato foi reduzida tanto na concentração de 50 mM quanto na de 500 mM de etanol. Esse resultado nos remete a questionar a vulnerabilidade do sistema glutamatérgico à toxicidade do etanol no período do desenvolvimento hipocampal (Fletcher & Shain, 1993; Tsuji et al., 2008). Pesquisas mostram que a exposição pré-natal e também perinatal (DPN 1-8) ao etanol leva a alterações hipocampais que perduram até a vida adulta, incluindo déficit no aprendizado e desregulação na expressão de genes de proteínas como EAAT1, NR2A, NR2B (Zink et al., 2011; Zink et al., 2004). Ou seja, o etanol é capaz de interferir no desenvolvimento, prejudicando e alterando o sistema glutamatérgico de forma que os efeitos perdurem até a adolescência.

Visto que a diminuição da captação pode aumentar a concentração de glutamato extracelular e levar a neurotoxicidade, parece que os filhotes expostos ao etanol na gestação apresentam uma maior vulnerabilidade a essa toxicidade.

Essa vulnerabilidade hipocampal nos filhotes expostos ao etanol durante o desenvolvimento também está presente em nossos resultados em relação às defesas antioxidantes, uma vez que observamos uma diminuição no conteúdo de GSH hipocampal nos filhotes submetidos ao modelo. A GSH é o antioxidante endógeno não-enzimático mais importante e essencial na detoxificação das ERO no SNC, principalmente nos astrócitos (Halliwell, 2006). A diminuição no conteúdo de GSH pode estar correlacionada com a diminuição da captação do glutamato, uma vez que o glutamato é um dos três aminoácidos que compõe o tripeptídeo glutatona (glicina, cisteína e glutamato). Além disso, a diminuição pode também estar associada ao prejuízo que etanol pode causar no sistema da glutatona peroxidase (Sistema GPx), uma vez que níveis diminuídos de GSH intracelular tem sido correlacionados com aumento do estresse oxidativo após a exposição pré-natal ao etanol (Browne & Armstrong, 1998; Zadák et al., 2009). Esse processo leva ao aumento de ERO e à diminuição dos níveis das defesas antioxidantes (GSH), causando um desequilíbrio redox que pode resultar em oxidação protéica, peroxidação de lipídios e dano no DNA (Brocardo et al., 2011). Assim, a exposição pré e pós-natal (DPN 1-7, equivalente ao terceiro trimestre gestacional em humanos) ao etanol parece aumentar o estresse oxidativo durante o desenvolvimento. Esses efeitos podem perdurar até a vida adulta, pela ineficiência do sistema de defesa antioxidante de reparar o dano após a toxicidade (Kumral et al., 2005; Smith et al., 2005). Juntos, os dados da diminuição da GSH e da captação de glutamato, após o tratamento pré-natal com

etanol, nos mostram uma maior vulnerabilidade aos efeitos tóxicos do etanol tanto no sistema glutamatérgico como na resposta ao estresse oxidativo, sendo que esses efeitos podem permanecer até a adolescência.

Resultados recentes do nosso laboratório mostraram que a captação de glutamato diminui após a administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) no último trimestre gestacional (Souza DF., et al, dados não publicados). Sabe-se que a exposição crônica ao etanol pode levar a uma resposta neuroinflamatória ativando as células astrogliais (Loureiro et al., 2012). O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas e tem sido amplamente utilizado na pesquisa a fim de estimular a resposta inflamatória no SNC (Haus-Wegrzyniak et al., 1998). A fim de testar se a vulnerabilidade à toxicidade do etanol na captação de glutamato poderia estar associada à resposta inflamatória durante o desenvolvimento, uma hora após a exposição aguda de LPS realizamos o ensaio da captação de glutamato. Nossos resultados mostraram que a captação de glutamato reduziu nas fatias hipocâmpais do grupo MPAE e do grupo veículo após o tratamento com LPS, quando comparado ao grupo controle. Esse resultado mostra novamente a maior vulnerabilidade dos animais submetidos ao modelo após um desafio neuroinflamatório (LPS). Curiosamente, o grupo veículo também mostrou uma redução significativa da captação de glutamato quando comparado ao grupo controle e será discutido no final desta seção.

A vulnerabilidade à toxicidade do etanol atinge diretamente os astrócitos, que respondem através da ativação ou alteração de marcadores astrogliais específicos, (Rutka et al., 1997). A GFAP é uma proteína utilizada como um marcador específico da resposta dos astrócitos após exposição a substâncias

tóxicas (Dalçik et al., 2009). Estudos que utilizam modelos de exposição aguda (*binge*) ao etanol, mostram astrogliose (Goodlett et al., 1993), ao passo que modelos de exposição pré-natal ao etanol mostram redução da GFAP e de seu mRNA (Vallés et al., 1996), ainda que esses resultados sejam controversos na literatura em função da dose e padrão de administração (Franke et al., 1997). Nossos resultados mostraram uma redução considerável no conteúdo de GFAP somente para o grupo MPAE quando o tecido hipocampal foi analisado pelo método de ELISA. No entanto, quando analisada somente a região CA1 do hipocampo pelo método de imunistoquímica, encontramos um aumento de GFAP. Conforme resultados encontrados em trabalhos anteriores, os efeitos do etanol no SNC em desenvolvimento não são uniformes, sendo que algumas regiões podem ser mais afetadas que outras (Eckardt et al., 1998). E ainda, dentro da mesma estrutura cerebral, diferentes resultados podem ser encontrados para regiões específicas distintas (Valenzuela et al., 2012). Esses resultados chamam a atenção para as diferenças dos efeitos do etanol de acordo com o estágio do desenvolvimento, uma vez que o mesmo tratamento afetou de forma distinta diferentes regiões do hipocampo. No último estágio de diferenciação neuronal, as células começam a expressar proteínas tipicamente presentes em neurônios maduros, como o NeuN, uma proteína nuclear específica dos neurônios. Nossos resultados mostraram que essa proteína neuronal não foi alterada, sugerindo que o número total de neurônios maduros não é diferente entre os grupos após o tratamento pré-natal sob dose moderada de etanol.

A GFAP é um dos alvos da proteína S100B, uma vez que a modulação do citoesqueleto e a regulação do crescimento e diferenciação celular são papéis exercidos pela S100B (Sen & Belli, 2007). Além disso, esta proteína tem exercido

um papel de marcador de dano em doenças neuropsiquiátricas, podendo ser utilizada como um parâmetro de ativação astrogliar ou de morte celular (Leite et al., 2006). Nosso estudo mostrou um aumento no conteúdo de S100B no LCR. Esse aumento pode sugerir um sinal de dano, mas também pode ser uma resposta do astrócito à toxicidade do etanol, numa tentativa de proteger as células. Interessantemente, houve um aumento de S100B no conteúdo hipocampal, mas não em GFAP, no grupo veículo. Variáveis que poderiam contribuir para o resultado de aumento da expressão de S100B no grupo veículo, como estresse pré-natal (Barros et al., 2006) ou dieta rica em calorias durante o período pré-natal e lactação (Wright et al., 2011), devem ser desconsideradas, à medida que o modelo animal utilizado não causou estresse aos animais e a quantidade de calorias ingeridas através da cerveja sem álcool foi limitada durante todo o tratamento.

Por fim, cabe comentar que o grupo veículo apresentou alguns resultados curiosos, uma vez que o esperado era que acompanhasse os efeitos do grupo controle. Foram observadas alterações para este grupo, não só na expressão de S100B, mas também no conteúdo de GSH e na captação de glutamato após exposição ao LPS, além desse grupo ter apresentado dificuldades para aprender a tarefa PMDAT. Esses resultados sugerem um efeito não só do etanol, mas também da própria cerveja sem álcool, sendo importante analisar futuramente os componentes desse tipo de cerveja. É importante lembrar que em outros estudos que utilizaram o modelo da cerveja sem álcool não houve diferença entre o grupo veículo e o grupo controle para palatabilidade e quantidade de cerveja ingerida (Samson et al., 1996; McGregor et al., 1999), porém poucos trabalhos usaram este modelo para exposição pré-natal, indicando que talvez

existam diferenças quando a cerveja é administrada *in útero* (Lancaster et al., 1987; Lancaster & Spiegel, 1992). Ainda, componentes da própria cerveja sem álcool podem também serem os responsáveis pelos efeitos observados. Um estudo realizado por Lancaster e colaboradores utilizou este modelo durante o período pré-natal e também observou efeitos inesperados com a cerveja sem álcool. Os animais apresentaram hipoglicemia e diferença no tamanho do fígado no período perinatal. Os autores suspeitam que este tipo de bebida possa conter compostos como chumbo, nitrosaminas, fitoestrógenos e inclusive quantidades pequenas de etanol que poderiam interferir nos resultados obtidos (Lancaster & Spiegel, 1992). Portanto, mais estudos são necessários a fim de determinar a natureza dos componentes, uma vez que a cerveja (Líber) utilizada nesses experimentos não foi testada para determinação de seus compostos químicos e congêneres.

4 Limitações e Considerações Finais

Esta tese procurou avaliar parâmetros gliais e comportamentais de filhotes adolescentes machos após a exposição pré e pós-natal ao álcool. No entanto, é importante lembrar que modelos animais apresentam limitações, embora tentem mimetizar os efeitos da exposição ao álcool durante a gestação em humanos, os padrões de consumo nem sempre podem ser extrapolados com grande fidedignidade.

Este trabalho utilizou-se de um modelo de exposição pré-natal a uma solução alcoólica por ingestão oral de livre-escolha sob uma dose moderada que não causou intoxicação, estresse ou interferiu na dieta nutricional das ratas mães

(Griffin, 2014). Ao optar pelas 24h de acesso à solução alcoólica é importante controlar a quantidade diária ingerida a fim de estabelecer a dose a ser administrada. No entanto, é difícil estabelecer com fidedignidade a CAS ao longo das 24h, diferentemente de quando o acesso é limitado a 1 hora de exposição, pois consegue-se melhor precisar o pico da CAS após este determinado tempo.

Outro fator limitante neste modelo foi a própria cerveja sem álcool (Líber - Ambev) utilizada como veículo para a administração pré-natal do etanol. Ao mesmo tempo que conferiu maior palatabilidade e adesão do animal ao consumo voluntário, apresentou também efeitos adversos inesperados na análise de alguns dos parâmetros investigados. Sobretudo, faz um alerta para que gestantes tenham cuidado ao ingerir cerveja sem álcool durante período gestacional.

5 Conclusões

Os resultados obtidos nessa tese mostram que o SNC passa por vários estágios de desenvolvimento, sendo particularmente vulnerável a agentes tóxicos, como o etanol. No entanto, a dose e o padrão da exposição nesse período são variáveis fundamentais que caracterizam os efeitos a serem encontrados. A exposição crônica a doses moderadas de etanol durante a gestação alcança CAS nas ratas mães inferior às encontradas em modelos animais de SAF, e ainda assim, foi capaz de causar efeitos tanto comportamentais como gliais.

Em termos de cognição e comportamento, o modelo não afetou a memória de curta duração, mas evidenciou uma diminuição da ansiedade nos ratos adolescentes machos expostos ao etanol no período pré-natal, diferente dos efeitos sedativos e euforizantes do álcool. Tal resultado sugere que este efeito esteja associado a um aumento no comportamento de risco, típico do período da adolescência, no qual a tomada de decisão, a impulsividade e o risco a abuso e dependência de drogas são mais exarcebados.

Considerando os parâmetros gliais investigados, o modelo foi capaz de provocar uma resposta astrogliar, mesmo sob uma dose moderada de etanol, causando alterações astrocíticas, tanto na morfologia, visto com a alteração na GFAP, como na função, observado com a alteração da S100B. A captação do glutamato diminuída mostrou a vulnerabilidade do sistema glutamatérgico frente ao etanol durante o desenvolvimento. Alterações no conteúdo de GSH sugere dano oxidativo que pode levar a prejuízos na integridade celular e alterações genéticas.

É importante ressaltar que quando falamos em período gestacional, mesmo doses moderadas devem ser evitadas, uma vez que etanol é capaz de interferir diretamente no desenvolvimento do feto. Estudos mostram que quantidades moderadas de bebida alcoólica apresentam uma melhora e até proteção em doenças cardíacas (Krenz & Korhuis, 2012; Kondo, 2004), no entanto, o caso não se aplica para a exposição pré-natal.

As intervenções terapêuticas necessitam de progresso no entendimento dos mecanismos e efeitos do etanol no SNC. Entender como a exposição pré-natal ao álcool interfere no desenvolvimento causando danos bioquímicos e comportamentais é de fundamental importância médica e econômica. Os alvos moleculares do SNC em desenvolvimento que sustentam os efeitos deletérios da ingestão moderada de etanol são ainda desconhecidos e não existe tratamento específico disponível para síndromes alcoólicas fetais. De fato, é melhor evitar a ingestão de álcool na gestação e amamentação, visto que mesmo doses moderadas podem causar alterações em diferentes parâmetros no SNC em desenvolvimento. Profissionais da saúde devem estar atentos aos impactos do etanol durante a gestação a fim de alertar sobre os possíveis danos.

6 Perspectivas

Sugerimos como investigações futuras:

- Avaliar o comportamento impulsivo, a tomada de decisão e também a atenção após o tratamento pré-natal sob doses moderadas de álcool.
- Avaliar outras estruturas cerebrais, como o córtex frontal e núcleo acumbens.
- Avaliar o dano oxidativo após a exposição ao etanol sob dose moderada, através da medida da atividade de enzimas como a SOD e a Catalase.
- Investigar a ocorrência de alterações em BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) após tratamento pré-natal sob doses moderadas.
- A quantificação das subunidades NR2A e NR2B dos receptores NMDA também são importantes, visto que este receptor é o principal alvo de ação do etanol e essas subunidades estão correlacionadas ao processo de memória e aprendizagem.
- Avaliar os efeitos da exposição pré-natal sob doses moderadas de etanol em filhotes fêmeas.

7 Referência

- Abbott NJ, Rönnbäck L and Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*. 7 (1), 41–53.
- Abel EL (1996) Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Birth Weight in Rats: Is There an Inverted U-Shaped Function? *Alcohol*. 13 (1), 99–102.
- Abel EL (1984) *Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Effects*. New York, NY
- Abulseoud OA, Camsari UM, Ruby CL, Kasasbeh A, Choi S and Choi D-S (2014) Attenuation of Ethanol Withdrawal by Ceftriaxone-Induced Upregulation of Glutamate Transporter EAAT2. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 39 (7), 1674–1684.
- Alfonso-Loeches S and Guerri C (2011) Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 48 (1), 19–47.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V and Haydon PG (1999) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 77 (9), 699–706.
- Aronne MP, Guadagnoli T, Fontanet P, Evrard SG and Brusco A (2011) Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. *Experimental neurology*. 229 (2), 364–371.
- Baba H, Nakahira K, Morita N, Tanaka F, Akita H and Ikenaka K (1997) GFAP gene expression during development of astrocyte. *Developmental neuroscience*. 19 (1), 49–57.
- Bammer G and Cheshier GB (1982) An analysis of some effects of ethanol on performance in a passive avoidance task. *Psychopharmacology*. 77 (1), 66–73.
- Barros VG, Rodríguez P, Martijena ID, Pérez A, Molina VA and Antonelli MC (2006) Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. *Synapse (New York, N.Y.)*. 60 (8), 609–618.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ and Zhang X (1993) Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 14 (1), 83–144.
- Bell JC, Raynes-Greenow C, Turner RM, Bower C, Nassar N and O’Leary CM (2014) Maternal Alcohol Consumption during Pregnancy and the Risk of Orofacial Clefts in Infants: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology*.

- Berman RF and Hannigan JH (2000) Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus*. 10 (1), 94–110.
- Bernardinelli Y, Muller D and Nikonenko I (2014) Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural plasticity*. 2014, 232105.
- Berry RB and Matthews DB (2004) Acute ethanol administration selectively impairs spatial memory in C57BL/6J mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 32 (1), 9–18.
- Blume SB (1985) Is social drinking during pregnancy harmless? There is reason to think not. *Advances in alcohol & substance abuse*. 5 (1-2), 209–219.
- Boulland J-L, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J and Chaudhry FA (2002) Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *The European journal of neuroscience*. 15 (10), 1615–1631.
- Brady ML, Diaz MR, Iuso A, Everett JC, Valenzuela CF and Caldwell KK (2013) Moderate prenatal alcohol exposure reduces plasticity and alters NMDA receptor subunit composition in the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 33 (3), 1062–1067.
- Brin T, Borucki K and Ambrosch A (2011) The influence of experimental alcohol load and alcohol intoxication on S100B concentrations. *Shock (Augusta, Ga.)*. 36 (4), 356–360.
- Brocardo PS, Gil-Mohapel J and Christie BR (2011) The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain research reviews*. 67 (1-2), 209–225.
- Brolese G, Lunardi P, Cunha NB, Engelke DS, Pedroso FL, Batassini C, Tramontina AC and Gonçalves C-A (2014) Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats. *Behavioural brain research*.
- Browne RW and Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology*. 108, 347–352.
- Burden MJ, Jacobson SW, Sokol RJ and Jacobson JL (2005) Effects of prenatal alcohol exposure on attention and working memory at 7.5 years of age. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 29 (3), 443–452.
- Burger PH, Goecke TW, Fasching PA, Moll G, Heinrich H, Beckmann MW and Kornhuber J (2011) [How does maternal alcohol consumption during pregnancy affect the development of attention deficit/hyperactivity syndrome in the child]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 79 (9), 500–506.

- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ and Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 22 (1), 183–192.
- Chefer V, Meis J, Wang G, Kuzmin A, Bakalkin G and Shippenberg T (2011) Repeated exposure to moderate doses of ethanol augments hippocampal glutamate neurotransmission by increasing release. *Addiction biology*. 16 (2), 229–237.
- Chen J-H (2012) Maternal alcohol use during pregnancy, birth weight and early behavioral outcomes. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 47 (6), 649–656.
- Chen W-JA, Maier SE, Parnell SE and West JR (2003) Alcohol and the developing brain: neuroanatomical studies. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 27 (2), 174–180.
- Chen X, Michaelis ML and Michaelis EK (1997) Effects of chronic ethanol treatment on the expression of calcium transport carriers and NMDA/glutamate receptor proteins in brain synaptic membranes. *Journal of neurochemistry*. 69 (4), 1559–1569.
- Cooper ZD, Jones JD and Comer SD (2012) Glial modulators: a novel pharmacological approach to altering the behavioral effects of abused substances. *Expert opinion on investigational drugs*. 21 (2), 169–178.
- Cortese BM, Mitchell TR, Galloway MP, Prevost KE, Fang J, Moore GJ and Uhde TW (2010) Region-specific alteration in brain glutamate: possible relationship to risk-taking behavior. *Physiology & behavior*. 99 (4), 445–450.
- Cotgreave IA and Gerdes RG (1998) Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochemical and biophysical research communications*. 242 (1), 1–9.
- Crews FT and Nixon K (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 44 (2), 115–127.
- Dalçık H, Yardimoglu M, Filiz S, Gonca S, Dalçık C and Erden BF (2009) Chronic ethanol-induced glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity: an immunocytochemical observation in various regions of adult rat brain. *The International journal of neuroscience*. 119 (9), 1303–1318.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*. 65 (1), 1–105.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J and Kanner BI (1992) An [Na⁺ + K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience*. 51 (2), 295–310.

- Diaz J and Samson HH (1980) Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science (New York, N.Y.)*. 208 (4445), 751–753.
- Dobbing J and Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early human development*. 3 (1), 79–83.
- Dobson CC, Mongillo DL, Poklewska-Koziell M, Winterborn A, Brien JF and Reynolds JN (2012) Sensitivity of modified Biel-maze task, compared with Y-maze task, to measure spatial learning and memory deficits of ethanol teratogenicity in the guinea pig. *Behavioural Brain Research*. 233 (1), 162–168.
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 33 (7), 637–668.
- Dong J, Sulik KK and Chen S (2010) The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicology letters*. 193 (1), 94–100.
- Dreosti IE (1993) Nutritional factors underlying the expression of the fetal alcohol syndrome. *Annual New York Academy Science*. 678, 193–204.
- Dringen R and Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biological chemistry*. 384 (4), 505–516.
- Druse MJ, Gillespie RA, Tajuddin NF and Rich M (2007) S100B-mediated protection against the pro-apoptotic effects of ethanol on fetal rhombencephalic neurons. *Brain research*. 1150, 46–54.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK and Tabakoff B (1998) Effect of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcoholic Clinical Experimental Research*. 22, 998–1040.
- Van Eldik LJ and Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 21 (3-4), 97–108.
- Eng LF, Ghirnikar RS and Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*. 25 (9-10), 1439–1451.
- Eravci M, Kley S, Pinna G, Prengel H, Brödel O, Hiedra L, Meinhold H and Baumgartner A (1999) Gene expression of glucose transporters and glycolytic enzymes in the CNS of rats behaviorally dependent on ethanol. *Brain research. Molecular brain research*. 65 (1), 103–111.
- Eriksen JL and Druse MJ (2001) Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. *Brain research. Developmental brain research*. 131 (1-2), 9–15.

- Fletcher TL and Shain W (1993) Ethanol-induced changes in astrocyte gene expression during rat central nervous system development. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 17 (5), 993–1001.
- Floyd RL, Decouflé P and Hungerford DW (1999) Alcohol use prior to pregnancy recognition. *American journal of preventive medicine*. 17 (2), 101–107.
- Foley TD and Rhoads DE (1992) Effects of ethanol on Na(+)-dependent amino acid uptake: dependence on rat age and Na⁺, K(+)-ATPase activity. *Brain research*. 593 (1), 39–44.
- Follesa P and Ticku MK (1996) Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *The Journal of biological chemistry*. 271 (23), 13297–13299.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of neurochemistry*. 42 (1), 1–11.
- Franke H, Kittner H, Berger P, Wirkner K and Schramek J (1997) The reaction of astrocytes and neurons in the hippocampus of adult rats during chronic ethanol treatment and correlations to behavioral impairments. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 14 (5), 445–454.
- Fryer SL, Tapert SF, Mattson SN, Paulus MP, Spadoni AD and Riley EP (2007) Prenatal alcohol exposure affects frontal-striatal BOLD response during inhibitory control. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 31 (8), 1415–1424.
- Gallate JE, Morley KC, Ambermoon P and McGregor IS (2003) The consequences of beer consumption in rats: acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. *Psychopharmacology*. 166 (1), 51–60.
- García-Marín V, García-López P and Freire M (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends in neurosciences*. 30 (9), 479–487.
- Gomes FC, Paulin D and Moura Neto V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*. 32 (5), 619–631.
- Gonçalves C-A, Leite MC and Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry*. 41 (10-11), 755–763.
- Goodlett CR, Horn KH and Zhou FC (2005) Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 230 (6), 394–406.

- Goodlett CR, Leo JT, O'Callaghan JP, Mahoney JC and West JR (1993) Transient cortical astrogliosis induced by alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt in rats. *Brain research. Developmental brain research.* 72 (1), 85–97.
- Goodlett CR and Lundahl KR (1996) Temporal determinants of neonatal alcohol-induced cerebellar damage and motor performance deficits. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 55 (4), 531–540.
- Goodlett CR and Peterson SD (1995) Sex differences in vulnerability to developmental spatial learning deficits induced by limited binge alcohol exposure in neonatal rats. *Neurobiology of learning and memory.* 64 (3), 265–275.
- Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST and Rodnight R (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain research.* 833 (2), 142–149.
- Grant TM, Huggins JE, Sampson PD, Ernst CC, Barr HM and Streissguth AP (2009) Alcohol use before and during pregnancy in western Washington, 1989–2004: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. *American journal of obstetrics and gynecology.* 200 (3), 278.e1–8.
- Griffin WC 3rd (2014) Alcohol dependence and free-choice drinking in mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.).* 48 (3), 287–293.
- Guerri C (1998) Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcoholism, clinical and experimental research.* 22 (2), 304–312.
- Guerri C and Pascual M (2010) Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.).* 44 (1), 15–26.
- Guerri C and Renau-Piqueras J (1997) Alcohol, astroglia, and brain development. *Molecular neurobiology.* 15 (1), 65–81.
- Gulick D and Gould TJ (2009) Interactive effects of ethanol and nicotine on learning, anxiety, and locomotion in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidance task. *Neuropharmacology.* 57 (3), 302–310.
- Gulick D and Gould TJ (2011) Nicotine acts in the anterior cingulate, but not dorsal or ventral hippocampus, to reverse ethanol-induced learning impairments in the plus-maze discriminative avoidance task. *Addiction biology.* 16 (1), 176–188.
- Haber M, Zhou L and Murai KK (2006) Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *The Journal of*

- neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 26 (35), 8881–8891.
- Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee S-Y, Abel T, Haydon PG and Frank MG (2009) Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron*. 61 (2), 213–219.
- Halassa MM and Haydon PG (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual review of physiology*. 72, 335–355.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 141 (2), 312–322.
- Hamilton DA, Akersa KG, Rice JP, Johnson TE, Candelaria-Cook FT, Maesb LI, Rosenberg M, Valenzuela CF and Savage DD (2010) 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. *Behavioural Brain Research*. 207, 290–304.
- Hargreaves GA, Monds L, Gunasekaran N, Dawson B and McGregor IS (2009) Intermittent access to beer promotes binge-like drinking in adolescent but not adult Wistar rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 43 (4), 305–314.
- Hargreaves GA, Quinn H, Kashem MA, Matsumoto I and McGregor IS (2009) Proteomic Analysis Demonstrates Adolescent Vulnerability to Lasting Hippocampal Changes Following Chronic Alcohol Consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 33 (1), 86–94.
- Hargreaves GA, Wang EYJ, Lawrence AJ and McGregor IS (2011) Beer promotes high levels of alcohol intake in adolescent and adult alcohol-preferring rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 45 (5), 485–498.
- Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M and Stoeckel ME (1998) Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain research*. 794 (2), 211–224.
- Helfer JL, White ER and Christie BR (2014) Prenatal ethanol (EtOH) exposure alters the sensitivity of the adult dentate gyrus to acute EtOH exposure. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 38 (1), 135–143.
- Herrmann AP, Lunardi P, Pilz LK, Tramontina AC, Linck VM, Okunji CO, Gonçalves CA and Elisabetsky E (2012) Effects of the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices. *Neurochemistry International*. 61 (7), 1144–1150.
- Hoffmann SE and Matthews DB (2001) Ethanol-induced impairments in spatial working memory are not due to deficits in learning. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 25 (6), 856–861.

- Hofmann CE, Patyk IA and Weinberg J (2005) Prenatal ethanol exposure: Sex differences in anxiety and anxiolytic response to a 5-HT_{1A} agonist. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 82, 549 – 558.
- Horner PJ and Palmer TD (2003) New roles for astrocytes: the nightlife of an ‘astrocyte’. *La vida loca! Trends in neurosciences*. 26 (11), 597–603.
- Hösli E and Hösli L (1993) Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*. 40 (4), 477–506.
- Howell KK, Lynch ME, Platzman KA, Smith GH and Coles CD (2006) Prenatal alcohol exposure and ability, academic achievement, and school functioning in adolescence: a longitudinal follow-up. *Journal of pediatric psychology*. 31 (1), 116–126.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K and Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science (New York, N.Y.)*. 287 (5455), 1056–1060.
- Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH and Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (15), 8733–8738.
- Kimelberg HK and Katz DM (1985) High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science (New York, N.Y.)*. 228 (4701), 889–891.
- Kimelberg HK and Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Scientific American*. 260 (4), 66–72, 74, 76.
- Kleindienst A and Ross Bullock M (2006) A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *Journal of neurotrauma*. 23 (8), 1185–1200.
- Kligman D and Marshak DR (1985) Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82 (20), 7136–7139.
- Kondo K (2004) Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *BioFactors (Oxford, England)*. 22 (1-4), 303–310.
- Koob GF and Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 35 (1), 217–238.
- Kotlinska J and Bochenski M (2008) The influence of various glutamate receptors antagonists on anxiety-like effect of ethanol withdrawal in a plus-maze test in rats. *European journal of pharmacology*. 598 (1-3), 57–63.

- Krenz M and Korthuis RJ (2012) Moderate ethanol ingestion and cardiovascular protection: from epidemiologic associations to cellular mechanisms. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 52 (1), 93–104.
- Kumari M and Ticku MK (2000) Regulation of NMDA receptors by ethanol. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progrès des recherches pharmaceutiques*. 54, 152–189.
- Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N and Ozkan H (2005) Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain research. Developmental brain research*. 160 (2), 146–156.
- Lancaster F, Spiegel K, Swineford L, Hart W, Mohuiddin R and Cooper J (1987) Maternal Ethanol Exposure With Adequate Protein in The Diet: Influence on Offspring Development. *Nutrition Research*. 7, 375–383.
- Lancaster FE, Brown TD, Coker KL, Elliott JA and Wren SB (1996) Sex differences in alcohol preference and drinking patterns emerge during the early postpubertal period. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 20 (6), 1043–1049.
- Lancaster FE and Spiegel KS (1992) Alcoholic and nonalcoholic beer drinking during gestation: offspring growth and glucose metabolism. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 9 (1), 9–15.
- Lancaster FE and Spiegel KS (1989) Voluntary beer drinking by pregnant rats: offspring sensitivity to ethanol and preference for beer. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 6 (3), 207–217.
- Leite MC, Brolese G, de Almeida LM, Pinero CC, Gottfried C and Goncalves CA (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull*. 70 (2), 179–85.
- Levitt P (1998) Prenatal effects of drugs of abuse on brain development. *Drug and alcohol dependence*. 51 (1-2), 109–125.
- Levy LM, Warr O and Attwell D (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 18 (23), 9620–9628.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D and Hoi Yu AC (2011) Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*. 8 (1), 67–80.
- Liappas I, Tzavellas EO, Kariyannis C, Piperi C, Schulpis C, Papassotiriou I and Soldatos CR (2006) Effect of alcohol detoxification on serum S-100B

- levels of alcohol-dependent individuals. *In vivo (Athens, Greece)*. 20 (5), 675–680.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92 (2), 180–185.
- Little RE and Wendt JK (1991) The effects of maternal drinking in the reproductive period: an epidemiologic review. *Journal of substance abuse*. 3 (2), 187–204.
- Livy DJ, Miller EK, Maier SE and West JR (2003) Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. *Neurotoxicology and teratology*. 25 (4), 447–458.
- Loureiro SO, Heimfarth L, de Lima BO, Leite MC, Guerra MC, Gonçalves CA and Pessoa-Pureur R (2012) Dual action of chronic ethanol treatment on LPS-induced response in C6 glioma cells. *Journal of neuroimmunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560157> (accessed 02/06/12).
- Lovinger DM, White G and Weight FF (1990) Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function. *Annals of medicine*. 22 (4), 247–252.
- Mann K, Hintz T and Jung M (2004) Does psychiatric comorbidity in alcohol-dependent patients affect treatment outcome? *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 254 (3), 172–181.
- Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K and Janigro D (2004) Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 342 (1-2), 1–12.
- Mathews A (1990) Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behaviour research and therapy*. 28 (6), 455–468.
- Mayer ML and Westbrook GL (1985) The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurones in culture. *The Journal of physiology*. 361, 65–90.
- McDonald JW, Shapiro SM, Silverstein FS and Johnston MV (1998) Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. *Experimental neurology*. 150 (1), 21–29.
- McGregor IS and Gallate JE (2004) Rats on the grog: novel pharmacotherapies for alcohol craving. *Addictive behaviors*. 29 (7), 1341–1357.
- McGregor IS, Saharov T, Hunt GE and Topple AN (1999) Beer consumption in rats: the influence of ethanol content, food deprivation, and cocaine. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 17 (1), 47–56.
- McKenna MC (2013) Glutamate Pays Its Own Way in Astrocytes. *Frontiers in endocrinology*. 4, 191.

- Melendez RI, Hicks MP, Cagle SS and Kalivas PW (2005) Ethanol exposure decreases glutamate uptake in the nucleus accumbens. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 29 (3), 326–333.
- Miguel-Hidalgo JJ (2009) The role of glial cells in drug abuse. *Current drug abuse reviews*. 2 (1), 72–82.
- De la Monte SM and Kril JJ (2014) Human alcohol-related neuropathology. *Acta neuropathologica*. 127 (1), 71–90.
- Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*. 19 (6), 739–744.
- Möykkynen T and Korpi ER (2012) Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 111 (1), 4–13.
- Naassila M and Daoust M (2002) Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on the developmental profile of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*. 80 (5), 850–860.
- Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, Almeida LMV, Leite MC, Thomazi AP, Gottfried C, Wofchuk ST, Donato R and Gonçalves C-A (2009) S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca²⁺ and K⁺. *Neurochemical Research*. 34 (9), 1603–1611.
- Netto CBO, Portela LV, Ferreira CT, Kieling C, Matte U, Felix T, da Silveira TR, Souza DO, Gonçalves C-A and Giugliani R (2005) Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clinical biochemistry*. 38 (5), 433–435.
- Olney JW (1990) Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 30, 47–71.
- Olson HC, Feldman JJ, Streissguth AP, Sampson PD and Bookstein FL (1998) Neuropsychological deficits in adolescents with fetal alcohol syndrome: clinical findings. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 22 (9), 1998–2012.
- Osborn JA, Kim CK, Steiger J and Weinberg J (1998) Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in male and female on the elevated plus maze. *Alcoholic Clinical Experimental Research*. 22 (3), 685–695.
- Osborn JA, Yu C, Gabriel K and Weinberg J (1998) Fetal ethanol effects on benzodiazepine sensitivity measured by behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 60 (3), 625–633.
- Ozawa S, Kamiya H and Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*. 54 (5), 581–618.

- Pascual M and Guerri C (2007) The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal-regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *Journal of neurochemistry*. 103 (2), 557–568.
- Peadon E, Payne J, Henley N, D'Antoine H, Bartu A, O'Leary C, Bower C and Elliott EJ (2011) Attitudes and behaviour predict women's intention to drink alcohol during pregnancy: the challenge for health professionals. *BMC public health*. 11, 584.
- Pearce IA, Cambray-Deakin MA and Burgoyne RD (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS letters*. 223 (1), 143–147.
- Pellerin L (2005) How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular neurobiology*. 32 (1), 59–72.
- Perea G and Araque A (2010) GLIA modulates synaptic transmission. *Brain research reviews*. 63 (1-2), 93–102.
- Petrova TV, Hu J and Van Eldik LJ (2000) Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain research*. 853 (1), 74–80.
- Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E and Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 360 (6403), 464–467.
- Rabacchi S, Bailly Y, Delhay-Bouchaud N and Mariani J (1992) Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science (New York, N.Y.)*. 256 (5065), 1823–1825.
- Ramos AJ, Evrard SG, Tagliaferro P, Tricárico MV and Brusco A (2002) Effects of chronic maternal ethanol exposure on hippocampal and striatal morphology in offspring. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 965, 343–353.
- Ron D (2004) Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 10 (4), 325–336.
- Rubert G, Miñana R, Pascual M and Guerri C (2006) Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *Journal of neuroscience research*. 84 (3), 483–496.
- Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, Jung S, Tsugu A and Matsuzawa K (1997) Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *Journal of neurosurgery*. 87 (3), 420–430.

- Ryabinin AE, Miller MN and Durrant S (2002) Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 71 (1-2), 307–312.
- Samson HH, Denning C and Chappelle AM (1996) The use of nonalcoholic beer as the vehicle for ethanol consumption in rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 13 (4), 365–368.
- Sanchez Vega MC, Chong S and Burne THJ (2013) Early gestational exposure to moderate concentrations of ethanol alters adult behaviour in C57BL/6J mice. *Behavioural brain research*. 252, 326–333.
- Sanday L, Patti CL, Zanin KA, Fernandes-Santos L, Oliveira LC, Kameda SR, Tufik S and Frussa-Filho R (2013) Ethanol-induced memory impairment in a discriminative avoidance task is state-dependent. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 37 Suppl 1, E30–39.
- Savage DD, Becher M, de la Torre AJ and Sutherland RJ (2002) Dose-dependent effects of prenatal ethanol exposure on synaptic plasticity and learning in mature offspring. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 26 (11), 1752–1758.
- Savage DD, Rosenberg MJ, Wolff CR, Akers KG, El-Emawy A, Staples MC, Varaschin RK, Wright CA, Seidel JL, Caldwell KK and Hamilton DA (2010) Effects of a novel cognition-enhancing agent on fetal ethanol-induced learning deficits. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 34 (10), 1793–1802.
- Schousboe A and Hertz L (1981) Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. *Advances in biochemical psychopharmacology*. 27, 103–113.
- Scotto C, Mély Y, Ohshima H, Garin J, Cochet C, Chambaz E and Baudier J (1998) Cysteine oxidation in the mitogenic S100B protein leads to changes in phosphorylation by catalytic CKII- α subunit. *The Journal of biological chemistry*. 273 (7), 3901–3908.
- Sen J and Belli A (2007) S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *Journal of neuroscience research*. 85 (7), 1373–1380.
- Shao Y and McCarthy KD (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia*. 11 (2), 147–155.
- Shigeri Y, Seal RP and Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain research. Brain research reviews*. 45 (3), 250–265.
- Silva RH, Bellot RG, Vital MA and Frussa-Filho R (1997) Effects of long-term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice. *Psychopharmacology*. 129 (4), 322–328.

- Silva RH and Frussa-Filho R (2002) Naltrexone potentiates both amnesic and anxiolytic effects of chlordiazepoxide in mice. *Life sciences*. 72 (6), 721–730.
- Silva RH and Frussa-Filho R (2000) The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of neuroscience methods*. 102 (2), 117–125.
- Silva RH, Kameda SR, Carvalho RC, Rigo GS, Costa KLB, Taricano ID and Frussa-Filho R (2002) Effects of amphetamine on the plus-maze discriminative avoidance task in mice. *Psychopharmacology*. 160 (1), 9–18.
- Silvers JM, Tokunaga S, Berry RB, White AM and Matthews DB (2003) Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. *Brain research. Brain research reviews*. 43 (3), 275–284.
- Smith AM, Zeve DR, Grisel JJ and Chen W-JA (2005) Neonatal alcohol exposure increases malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in the developing cerebellum. *Brain research. Developmental brain research*. 160 (2), 231–238.
- Smith KL, John CS, Sypek EI, Ongür D, Cohen BM, Barry SM and Bechtholt AJ (2014) Exploring the role of central astrocytic glutamate uptake in ethanol reward in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 38 (5), 1307–1314.
- Sood B, Delaney-Black V, Covington C, Nordstrom-Klee B, Ager J, Templin T, Janisse J, Martier S and Sokol RJ (2001) Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years: I. dose-response effect. *Pediatrics*. 108 (2), E34.
- De Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB and Gonçalves C-A (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *Journal of neuroimmunology*. 206 (1-2), 52–57.
- Steiner J, Schmitt A, Schroeter ML, Bogerts B, Falkai P, Turck CW and Martins-de-Souza D (2014) S100B is downregulated in the nuclear proteome of schizophrenia corpus callosum. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*.
- Steinhäuser C and Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trends in neurosciences*. 19 (8), 339–345.
- Steullet P, Neijt HC, Cuénod M and Do KQ (2006) Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience*. 137 (3), 807–819.

- Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA and Smith DF (1991) Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 265 (15), 1961–1967.
- Sudakov KV (2008) [Evolution of the stress concept]. *Vestnik Rossijskoj Akademii Meditsinskikh Nauk / Rossijskaia Akademiia Meditsinskikh Nauk*. (11), 59–66.
- Suzuki K (2007) Neuropathology of developmental abnormalities. *Brain & development*. 29 (3), 129–141.
- Tanaka K (1993) Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. *Neuroscience letters*. 159 (1-2), 183–186.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G and Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*. 401 (6748), 63–69.
- Thomas JD, Burchette TL, Dominguez HD and Riley EP (2000) Neonatal alcohol exposure produces more severe motor coordination deficits in high alcohol sensitive rats compared to low alcohol sensitive rats. *Alcohol*. 20 (1), 93–99.
- Tolliver GA and Samson HH (1991) The influence of early postweaning ethanol exposure on oral self-administration behavior in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 38 (3), 575–580.
- Torp R, Danbolt NC, Babaie E, Bjørås M, Seeberg E, Storm-Mathisen J and Ottersen OP (1994) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *The European journal of neuroscience*. 6 (6), 936–942.
- Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST and Gonçalves C-A (2006) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cellular and molecular neurobiology*. 26 (1), 81–86.
- Tsai G (1998) Glutamatergic neurotransmission in alcoholism. *Journal of biomedical science*. 5 (5), 309–320.
- Tsuji R, Fattori V, Abe S, Costa LG and Kobayashi K (2008) Effects of postnatal ethanol exposure at different developmental phases on neurotrophic factors and phosphorylated proteins on signal transductions in rat brain. *Neurotoxicology and teratology*. 30 (3), 228–236.
- Uban KA, Sliwowska JH, Lieblich S, Ellis LA, Yu WK, Weinberg J and Galea LAM (2010) Prenatal alcohol exposure reduces the proportion of newly produced neurons and glia in the dentate gyrus of the hippocampus in female rats. *Hormones and behavior*. 58 (5), 835–843.

- Valenzuela CF, Morton RA, Diaz MR and Topper L (2012) Does moderate drinking harm the fetal brain? Insights from animal models. *Trends in neurosciences*. 35 (5), 284–292.
- Vallés S, Sancho-Tello M, Miñana R, Climent E, Renau-Piqueras J and Guerri C (1996) Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. *Journal of neurochemistry*. 67 (6), 2425–2433.
- Vendruscolo LF and Roberts AJ (2013) Operant alcohol self-administration in dependent rats: Focus on the vapor model. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A and Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *British journal of pharmacology*. 154 (2), 299–315.
- Walker MJ, Al-Sahab B, Islam F and Tamim H (2011) The epidemiology of alcohol utilization during pregnancy: an analysis of the Canadian Maternity Experiences Survey (MES). *BMC pregnancy and childbirth*. 11, 52.
- Walz W (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in neurobiology*. 33 (4), 309–333.
- Wedekind D, Neumann K, Falkai P, Malchow B, Engel KR, Jamrozinski K and Havemann-Reinecke U (2011) S100B and homocysteine in the acute alcohol withdrawal syndrome. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 261 (2), 133–138.
- Weinberg J, D'Alquen G and Bczio S (1990) Interactive effects of ethanol intake and maternal nutritional status on skeletal development of fetal rats. *Alcohol*. 7, 383–388.
- Wiener S, Shoemaker WI, Koda LY, Bloom FE and 1981 216; (1981) Interaction of ethanol and nutrition during gestation. Influence on maternal and offspring development in the rat. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 216, 572–579.
- World Health Organization (2004) Global Status Report on Alcohol. *Geneva: Department of Mental Health and Substance Abuse*, 1–94.
- Worrall S, de Jersey J and Wilce PA (2000) Comparison of the formation of proteins modified by direct and indirect ethanol metabolites in the liver and blood of rats fed the Lieber-DeCarli liquid diet. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 35 (2), 164–170.
- Wright TM, Fone KCF, Langley-Evans SC and Voigt J-PW (2011) Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 29 (8), 785–793.

- Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková D and Stetina R (2009) Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 58 Suppl 1, S13–17.
- Zhou Y and Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*.
- Zink M, Ferbert T, Frank ST, Seufert P, Gebicke-Haerter PJ and Spanagel R (2011) Perinatal exposure to alcohol disturbs spatial learning and glutamate transmission-related gene expression in the adult hippocampus. *The European journal of neuroscience*. 34 (3), 457–468.
- Zink M, Schmitt A, Vengeliene V, Henn FA and Spanagel R (2004) Ethanol induces expression of the glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 in organotypic cortical slice cultures. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 28 (11), 1752–1757.
- Zorumski CF, Mennerick S and Izumi Y (2014) Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 48 (1), 1–17.
- Zuccolo L, Lewis SJ, Smith GD, Sayal K, Draper ES, Fraser R, Barrow M, Alati R, Ring S, Macleod J, Golding J, Heron J and Gray R (2013) Prenatal alcohol exposure and offspring cognition and school performance. A ‘Mendelian randomization’ natural experiment. *International journal of epidemiology*. 42 (5), 1358–1370.