

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

MARCADORES DE DESENVOLVIMENTO EM FILHOTES DE RATAS EXPOSTAS
AO ÁLCOOL NO PERÍODO PRÉ-NATAL

Mestranda: Giovana Brolese

Orientadora: Prof^a. Lisiane Bizarro Araújo

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2009

MARCADORES DE DESENVOLVIMENTO EM FILHOTES DE RATAS EXPOSTAS
AO ÁLCOOL NO PERÍODO PRÉ-NATAL

Giovana Brolese

Orientadora: Lisiane Bizarro Araújo

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências, como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, dezembro de 2009.

*aos meus pais
Valdemir Brolese e
Nelci Maria Spinelli Brolese*

*e ao meu marido
Tiago Xavier Bai,
o amor e o presente da minha vida.*

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos o tempo todo.”

(Robert Collier)

AGRADECIMENTOS

Obrigada Lisi, minha orientadora, pela oportunidade e por acreditar em mim desde o início do projeto. Foi muito bom trabalhar com ela, cresci muito profissionalmente e pessoalmente.

Obrigada, LabS100, em especial a, Carmem, Lets e Dani, e também a Kati e a Beta (que até nos experimentos me ajudaram), pois, além de amigas são excelentes profissionais e participaram de toda a minha jornada.

Obrigada em especial ao CA, um professor exemplar, em quem me inspirei desde o início da faculdade, quando fui bolsista de iniciação científica. Com o seu humor e simpatia, tens o dom de despertar nos alunos a vontade pela ciência. Sou tua fã, podes ter certeza disso!! Junto a ele agradeço imensamente a minha “mestra” Marina que me ensinou os primeiros passos a serem dados dentro de um laboratório de pesquisa e, além disso, tornou-se uma amiga que levo no coração.

Obrigada a todos do LPNeC, em especial as bolsistas Ana Taís e Renata por todo apoio, carinho e dedicação, inclusive nos finais de semana, e ao João e o Guto pelo empenho e força de vontade. Vocês todos foram fundamentais na realização dos experimentos. Também a Ivani e ao Stéfano que foram os colegas certos que chegaram na hora certa. Vocês todos foram e são essenciais para o sucesso do projeto.

Obrigada, Fabíola, sem o teu conhecimento, vontade de trabalhar e dedicação ao projeto teria sido muito complicado. Foi muito bom poder contar contigo e com a tua habilidade de resolver os problemas desde o início do nosso trabalho.

Agradeço também aos amigos londrinos Jorge, Sara, Suzan, Catherine, Karolina e Tomasz que me acolheram, ajudaram, ensinaram e me divertiram em Londres, nesses seis meses de trabalho.

Obrigado é muito pouco para dizer aos meus pais, Nelci e Valdemir, a minha irmã Grazi, a minha vó Julita e também minha madrinha Inês, o quão importante vocês foram nessa etapa da minha vida. Vocês são a minha base, minha emoção, minha felicidade, minha vida. Obrigada por todo apoio incondicional nesse período, principalmente nos seis meses que passamos distantes. Viu mãe?! Serei mestre agora! Mas vocês sempre foram os mestres da minha vida!! Amo vocês!

E, finalmente, ao meu marido lindo, Tiago, a quem não tenho palavras para descrever o quanto foi e é importante na minha vida. Obrigada por todo apoio nas noites e finais de semana de trabalho, por toda ajuda técnica de informática e também emocional. Obrigada por estar sempre ao meu lado durante todo esse tempo, e mesmo distante por seis meses tu estavas perto. E, obrigado, principalmente, por me amar tão sinceramente como eu te amo.

RESUMO

A exposição pré-natal ao álcool é uma das principais causas evitáveis de prejuízos ocasionados no nascimento, bem como alterações no desenvolvimento e comportamento do bebê. Ainda não se sabe qual a dose suficiente para causar danos psiconeurobiológicos. Esse fato é preocupante, visto que o consumo de álcool durante a gestação envolve risco de embriotoxicidade e teratogenicidade fetal. Com modelos animais de exposição pré-natal ao álcool é possível evidenciar diferentes tipos de prejuízos. A utilização de uma dieta líquida para administração via oral torna a exposição ao álcool menos estressante e indolor para o animal. O presente trabalho pretende verificar os efeitos de diferentes doses de etanol, no desenvolvimento, maturação e comportamento de filhotes cujas mães foram expostas ao álcool no período pré-natal. Para o experimento principal foram necessários ratos Lister Hooded (93 fêmeas e 31 machos) em idade reprodutiva (45-60 dias) para os acasalamentos. Durante a gestação as ratas do grupo tratado receberam uma dieta líquida nutricionalmente balanceada com duas diferentes doses de álcool (10 e 26%), enquanto os grupos controles receberam a mesma dieta líquida sem álcool ou apenas ração e água. O período de exposição à dieta líquida seguiu-se até o dia do parto. Os testes de desenvolvimento (peso, reflexo postural, geotaxia negativa e força de agarrar), maturação (abertura dos olhos e erupção dos dentes incisivos) e comportamento (campo aberto e labirinto em cruz elevado) foram realizados entre o primeiro dia pós-natal (DPN) e o DPN 60. Após 22 dias de exposição ao álcool cinco ratas foram sacrificadas para a verificação dos níveis de álcool no sangue. Durante os experimentos foi constatada uma alta taxa de mortalidade por canibalismo nas ninhadas. Nos testes, foi observado um atraso no desenvolvimento reflexo nos primeiros dias de vida, em que os ratos expostos à dieta líquida com etanol mostraram-se atrasados em relação aos grupos controles, no entanto, não foi observado diferença de peso ao nascer entre os grupos. Os grupos tratados com álcool demonstraram atraso na erupção dos dentes incisivos quando comparados aos grupos controle. No teste de comportamento labirinto em cruz elevado, o grupo tratado com 26% de álcool apresentou maior número de entradas no braço aberto e no braço fechado, permaneceu mais tempo no braço aberto e fez o maior número de respostas de risco. Os prejuízos causados pelo álcool podem variar de acordo com os fatores envolvidos, como os níveis de alcoolemia, quantidade de álcool ingerida, suscetibilidade da espécie e do ambiente, entre outros. No entanto, mesmo sob doses moderadas foi possível verificar que o etanol administrado no período pré-natal pode ocasionar prejuízos motores, maturacionais e comportamentais, não sendo “segura” a ingestão alcoólica durante o período gestacional.

ABSTRACT

Prenatal alcohol exposure is one of the main avoidable causes of birth defects, including developmental and behavioral dysfunctions. The minimum quantity of alcohol required to develop psyconeurobiological damage is still unknown. However, it is well known that alcohol intake during the gestational period can lead to fetal embryotoxicity and teratogenicity. The present work intends to show the effects of different alcohol doses on development, maturation and behavior of pups whose mothers were exposed to alcohol during gestation. For this we used an animal model of prenatal alcohol exposure. A liquid diet administrated orally was chosen as a painless and stress free exposure to alcohol for the animal. For the main experiment we used Lister Hooded rats (93 females and 31 males) in reproductive age (45-60 days). During the gestational period, two groups of rats were given a nutritionally balanced liquid diet with two different alcohol doses, 10% and 26% respectively. Control groups were delivered the same liquid diet but without alcohol or alternatively dry food and water ad libitum. The exposure period to the liquid diet was suspended on the day of parturition. The developmental tests (weight, righting reflex, negative geotaxis and grip strength), maturational tests (eyes opening and incisors eruption) and behavioral tests (open field and elevated plus maze) were preformed between the first postnatal day (PND) and PND 60. After 22 days of alcohol exposure, five female rats were sacrificed for blood alcohol levels analysis. During the experiment we observed high litter mortality due to cannibalism. Pups from the alcohol group showed delayed righting reflex development in the first days of life compared with control groups. However, no weight difference at birth was found between the groups. Alcohol exposed groups also showed a delay in incisors eruption when compared with controls. In the elevated plus maze test, the alcohol group exposed to 26% of alcohol showed a higher number of entry in open arms and closed arms, spent more time in open arms and had the highest number of risk response. The damages caused by alcohol intake during the gestational period can be different depending on several factors such as, alcohol intake, blood alcohol levels or species susceptibility. Nevertheless, we could show that even a moderate alcohol intake during gestational period is not “safe” and as a result, motor, maturational and behavioral defects can arise.

LISTA DE ABREVIATURAS

A10 – grupo que recebeu dieta líquida com 10% das calorias derivadas do álcool

A26 - grupo que recebeu dieta líquida com 26% das calorias derivadas do álcool

A44 - grupo que recebeu dieta líquida com 44% das calorias derivadas do álcool

BA – braço aberto do labirinto em cruz elevado

BF – braço fechado do labirinto em cruz elevado

C10 – grupo controle que recebeu dieta líquida sem álcool

C26 - grupo controle que recebeu dieta líquida sem álcool

C44 - grupo controle que recebeu dieta líquida sem álcool

Chow – grupo controle padrão (recebeu ração e água à vontade)

DG – dia gestacional

DPN – dia pós-natal

EPM – erro padrão da média

GLM – “general linear model”

LCE – labirinto em cruz elevado

PA – padrão analítico

SAF – síndrome alcoólica fetal

SNC – sistema nervoso central

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
SUMÁRIO.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
Álcool na Gestação.....	1
Os Prejuízos da Exposição Pré-natal ao Álcool.....	4
Modelo Animal de Exposição Pré-Natal	11
Dieta Líquida com Etanol.....	12
Desenvolvimento Pós-Natal.....	14
<u>1.1.1. Desenvolvimento Pós-Natal em Ratos.....</u>	<u>16</u>
Observação de Reflexos.....	19
<u>1.1.2. Geotaxia Negativa.....</u>	<u>19</u>
<u>1.1.3. Reflexo Postural e Reflexo de Agarrar.....</u>	<u>20</u>
QUESTÃO DE PESQUISA.....	22
OBJETIVOS.....	23
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos.....	23

MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
Estudo 1 (Piloto)- Efeitos no desenvolvimento e maturação de filhotes expostos à 44% de calorias derivadas do etanol durante o período pré-natal.....	25
Sujeitos.....	25
1.1.4. Droga e Instrumentos.....	26
1.1.5. Procedimentos.....	27
1.1.6. Acasalamento.....	29
1.1.7. Testes de Desenvolvimento.....	31
1.1.8. Testes de Comportamento.....	33
1.1.9. Análise dos Dados.....	34
Estudo 2 - Efeitos no desenvolvimento, maturação e comportamento de filhotes expostos à 10 e 26% de calorias derivadas do etanol durante o período pré-natal.....	35
1.1.10. Sujeitos.....	35
1.1.11. Droga e Instrumentos.....	35
1.1.12. Procedimentos.....	37
1.1.13. Implantes Uterinos.....	40
1.1.14. Análise dos níveis de álcool no sangue.....	40
1.1.15. Testes de Desenvolvimento.....	41
1.1.16. Testes de Comportamento.....	41
1.1.17. Análise Estatística dos Dados.....	42
RESULTADOS.....	44
Estudo 1- Piloto.....	44
Estudo 2.....	48
1.1.18. Análise dos Implantes Uterinos.....	49
1.1.19. Teste do Reflexo Postural.....	49
1.1.20. Peso.....	51
1.1.21. Teste Geotaxia Negativa.....	52
1.1.22. Teste de Força de Agarrar.....	52
1.1.23. Erupção do dente Incisivo e abertura dos olhos.....	53
1.1.24. Teste do Campo Aberto.....	55
1.1.25. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	56
1.1.26. Análise dos níveis de álcool no sangue.....	60
DISCUSSÃO.....	62
Questões metodológicas.....	63
1.1.27. Estudo 1 - Piloto.....	63
1.1.28. Estudo 2.....	66
Testes de reflexos.....	70

Testes maturacionais.....	73
Testes comportamentais.....	75
Análise dos níveis de álcool no sangue.....	78
CONCLUSÃO.....	80
PERSPECTIVAS.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

Introdução

Álcool na Gestação

Estima-se que, aproximadamente, 20% das mulheres consumam bebidas alcoólicas durante a gravidez. Também conhecido como álcool etílico ou etanol, o consumo de álcool pode variar de intensidade sendo que o uso freqüente (sete ou mais drinques por semana, ou cinco ou mais drinques por ocasião) entre as mulheres tem aumentado, significativamente, nos últimos anos (Alderazi & Brett, 2007; Wong et al., 2008).

Segundo o primeiro levantamento domiciliar sobre uso de drogas no país, feito pela Secretaria Nacional Antidrogas (Senad), o álcool é a principal droga consumida pelos brasileiros. O estudo mostra que 11,2% da população são dependentes do álcool. Estima-se que dois bilhões de pessoas no mundo possuam problemas relacionados ao abuso e/ou dependência de álcool.

Apesar de muitas das consequências do etanol no desenvolvimento infantil em filhos de mães alcoolistas sejam pouco conhecidas entre a população em geral, em sua extensão e gravidade, a síndrome alcoólica fetal está muito bem descrita na literatura (Fiorentin & Vargas, 2006). Já em 1899, Willian Sullivan, médico de uma prisão em Liverpool, publicou um estudo sobre 600 crianças, filhas de mães alcoólatras tendo algumas mulheres não alcoólatras como grupo de comparação onde relatou ter encontrado o maior número de natimortos e mortalidade

nos primeiros dois anos de vida no grupo de filhos de alcoólatras (Jones & Smith, 1973; Silva, 2000).

O uso de álcool, durante a gestação, é uma das principais causas evitáveis de defeitos ao nascimento bem como alterações no desenvolvimento da criança. Segundo a literatura o conceito de beber excessivamente é ainda controverso, pois as doses (quantidades de álcool por drinque) ainda não são bem esclarecidas podendo variar de acordo com os costumes e a cultura regional. Ainda não se sabe qual a dose suficiente para ocasionar danos psiconeurobiológicos. Esse fato é preocupante, principalmente quando o consumo de álcool durante a gestação envolve grande risco, devido à embriotoxicidade e a teratogenicidade fetal que a ele estão relacionadas, transformando-se em um sério problema de saúde pública (Alderazi & Brett, 2007; Wong et al., 2008).

O padrão de beber das mulheres vem mudando. Atualmente, cada vez mais mulheres e adolescentes fazem o uso do álcool (Alderazi & Brett, 2007). Na Europa, em 2004, dados epidemiológicos confirmaram que a taxa de mulheres que fazem uso de álcool regularmente vem crescendo mais rapidamente do que a dos homens e a percentagem entre adolescentes femininas equiparavam-se à taxa masculina (European Monitoring Centre for Drugs Addictions – EMCDDA, 2005). Muitas vezes, as mulheres engravidam e continuam a fazer o uso de álcool ao longo da gravidez, expondo o bebê a concentrações tóxicas do álcool.

Um estudo recente de Hellemans e colaboradores demonstrou que crianças associadas a desordens devido à exposição pré-natal ao álcool podem apresentar características de desordens depressivas e de transtornos de ansiedade devido à alteração do Eixo-HPA (Eixo hipotálamo-hipófise – adrenal). O álcool utilizado no período pré-natal é capaz de aumentar o tônus do eixo e

causar alteração do mesmo ao longo da vida (Hellemans, Verma, Yoon, Yu, & Weinberg, 2008). Em 2005, Hofmann e colaboradores apresentaram um dos primeiros trabalhos demonstrando que ratos expostos ao álcool (dieta líquida com 36% das calorias derivadas do etanol) no período pré-natal apresentaram comportamento ansioso elevado na idade adulta, sendo que esse processo poderia estar sendo mediado por receptores do tipo 5-HT-1A (Hofmann, Patyk, & Weinberg, 2005). Além disso, o álcool no período pré-natal poderia influenciar na atividade locomotora durante o desenvolvimento do neonato causando hiperatividade da prole (Gibson, Butters, Reynolds, & Brien, 2000).

Um dos fatores de risco ocasionados e relacionado com a ingestão de etanol durante a fase pré-natal é a desnutrição materna (Ferrari, Gabrielli, & Mello, 1992). O mecanismo fisiológico de nutrição fetal caracteriza-se, a partir do momento da fecundação, na relação de dependência entre a mãe e feto que começa a se desenvolver. Inicia-se uma integração de dois seres em um mesmo organismo, suscetível a todas as ações ou influências que venham envolvê-lo. O etanol é uma molécula de caráter polar e hidrossolúvel, por isso, difunde-se facilmente pelo sangue e nos fluidos biológicos. Ao ser ingerido pela gestante, tanto na forma íntegra como também após ser oxidado a acetadeído, pode atravessar a barreira placentária e fazer com que o feto receba as mesmas concentrações da substância que a mãe, podendo prejudicar o desenvolvimento fetal (Sandler, 1980). Para evitar a toxicidade do etanol na circulação sanguínea, o fígado é o principal responsável pela oxidação do etanol produzindo a enzima álcool-desidrogenase (ADH), converter o etanol em *acetadeído* e a este em *acetato*, pela enzima aldeído-desidrogenase que são capazes de fazer a transformação, sendo eliminado do organismo, basicamente, pela urina. A exposição fetal é agravada devido ao fato de que o metabolismo e a eliminação são mais lentos, fazendo com que o líquido amniótico permaneça impregnado de

etanol não modificado em acetaldeído. Essa situação é ocasionada pela ausência de enzimas específicas de oxidação e subsequente eliminação do etanol do sangue em quantidade necessária para a degradação até que seja biotransformado e, então, eliminado do organismo (Sandler, 1980; Shankar, Ronis, & Badger, 2007).

Os Prejuízos da Exposição Pré-natal ao Álcool

O álcool é capaz de atravessar rapidamente a barreira placentária e alcançar concentrações no feto semelhantes às encontradas no sangue materno. Crianças que foram expostas ao álcool durante o período pré-natal podem sofrer prejuízos cognitivos, maturacionais e comportamentais (Abel, 1988; Carneiro, 2005; Streissguth, Herman, & Smith, 1978). Estudos de neuroimagem identificaram mudanças em diferentes estruturas cerebrais dessas crianças incluindo os gânglios da base, corpo caloso, cerebelo e o hipocampo contribuindo para os déficits cognitivos (Carneiro, 2005). Entretanto, a extensão e a severidade do problema das crianças nessas condições dependem de vários fatores, entre eles, a quantidade de álcool consumida pela mãe na gravidez, e a frequência e o período gestacional em que o álcool é utilizado.

Existem evidências que quanto maior o consumo de álcool durante a gravidez, maior a incidência das anomalias físicas, seguindo uma curva dose-resposta. O que inclui o etanol na classe das drogas considerada teratogênica para humanos, sendo que esse efeito tem sido mostrado em diversos estudos com animais (Chernoff, 1977; Jacobson et al., 1993; Kronick, 1976; Randall & Taylor, 1979; Rosman & Malone, 1976; Tze & Lee, 1977). As anomalias

físicas estão, principalmente no primeiro trimestre gestacional e parto prematuro no segundo trimestre gestacional, aumentando de duas a quatro vezes a incidência de aborto espontâneo no segundo trimestre (Wong et al., 2008).

A severidade dos danos causados pela exposição ao álcool no período pré-natal varia, sendo uma das conseqüências mais graves já descritas a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF). Os efeitos da exposição pré-natal ao álcool foram primeiramente caracterizados por Lemoine et al, em 1968, na França e depois descritos por Jones e Smith em 1973 nos Estados Unidos (Jones, Smith, Streissguth, & Myrianthopoulos, 1974; Jones & Smith, 1973; Palmer, Ouellette, Warner, & Leichtman, 1974; Ulleland, 1972). Estudos demonstraram que a SAF ocorre em cerca de um terço dos bebês nascidos de mães alcoólatras que bebem a partir de 100 g de álcool diariamente durante a gravidez (Jones et al., 1974; Ouellette & Rosett, 1976; Rosett, Ouellette, Weiner, & Owens, 1978). São caracterizadas por déficit de crescimento pré-natal ou pós-natal, características faciais (como fissuras palpebrais curtas e lábio superior fino), déficit da coordenação motora fina e déficit no funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC) do feto, entre outras anomalias congênitas - extremidades, coração e rins - (Jones & Smith, 1973; Sandler, 1980), sendo que os sintomas não estão sempre todos presentes na mesma criança.

Um estudo recente com ratos tratados por gavagem (3g/kg/dia) com etanol demonstrou que a droga causou prejuízos no desenvolvimento desses animais, incluindo alterações na migração neuronal e microcefalia. Essas alterações podem ajudar a explicar as disfunções relatadas na SAF (Jerônimo, Filho, & Júnior, 2008).

É bastante comum observar crianças com sintomas que não coincidem com a definição de SAF. Neste caso eles são referidos como *efeitos alcoólicos fetais (EAF)*, o mais importante

dos quais é a inibição do crescimento. É provável que, além do álcool, outros fatores desempenhem um papel neste caso, já que apenas de 2.5% a 10% das mães alcoólicas dão à luz filhos com sintomas absolutos de SAF. Estudos têm mostrado que o consumo de álcool no período pré-natal pode ser um fator preponderante no aparecimento do Transtorno de Déficit de Atenção e hiperatividade (TDAH), visto que indivíduos, cujas mães utilizaram álcool durante a gravidez, tendem a ser hiperativos na adolescência (Katragadda & Schubiner, 2007; Tripp & Wickens, 2009). Esses problemas geralmente emergem na idade escolar e podem perdurar na idade adulta (Ernst, Robinson, & Moolchan, 2001; Linnet et al., 2003; Mick, Biederman, Faraone, Sayer, & Kleinman, 2002).

Enquanto a SAF é bem descrita na literatura, os efeitos de doses leves e moderadas de álcool na gravidez, não são bem determinados, mas é provável que exista um continuum de efeitos. A dose e a frequência da ingestão alcoólica são determinantes no aparecimento de prejuízos fetais; assim como outros fatores adjuvantes como: a genética, o estado nutricional da mãe, a idade, e o período de exposição.

Dados de um estudo de 1988, da “*National Maternal and Infant Health Survey*”, revelaram que metade das mulheres ingeriram álcool nos três primeiros meses de gestação, antes mesmo do diagnóstico positivo para gestação, sendo que 5% relataram consumir seis ou mais *drinks* por semana (Barash & Weinstein, 2002). Estudos sobre as consequências de baixa ou alta exposição ao álcool são importantes porque os limites para o aparecimento de efeitos teratogênico do álcool ainda são desconhecidos. Os estudos nesta área ainda são contraditórios. O critério para um “heavy drinker”, por exemplo, varia consideravelmente entre os estudos. Os limites de consumo, na maioria dos casos, estão relacionados em torno do termo “bebedor social”, aquele que aprende a beber para desfrutar de um estado de euforia e se aliviar de um

estado estressante, no entanto, o limite mínimo necessário para o álcool produzir efeitos teratogênicos ainda não está bem estabelecido. Efeitos adversos com menos de dois *drinks* (duas latas de cerveja) por dia ainda não foram bem relatados (Streissguth, Landesman-Dwyer, Martins, & Smith, 1980). Além disso, estudos clínicos indicam que a utilização de etanol durante o período gestacional aumenta o risco dos filhos de adquirir dependência de etanol e outras drogas de abuso (Barbier, Warnalt, Daoust, & Naassila, 2009).

A literatura apresenta modelos animais envolvendo administração de álcool no período pré-natal que levam a prejuízos irreversíveis (Chernoff, 1977; Coles & Miller, 1992; Hannigan, 1996). Têm-se definido como “Modelos animais relacionados com os prejuízos ocasionados pelo álcool” (ARBDS – *alcohol-related birth defects*) e também como “Desordens de nerodesenvolvimento ocasionadas pelo prejuízo do álcool” (ARNDS – *alcohol-related neurodevelopmental disorder*) (Stratton, Howe, & Battaglia, 1996). Segundo Hannigan não existe um modelo animal para a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), visto que ratas que recebem álcool durante a gestação não dispõem de todos os sinais clínicos vistos em humanos. Existe sim, um modelo animal de “Desordens de nerodesenvolvimento ocasionadas pelo prejuízo do álcool” (ARNDS) (Hannigan, 1996). Entretanto, avanços significativos têm sido realizados que se aproximam aos mecanismos clínicos específicos da SAF (Driscoll, Streissguth, & Riley, 1990). A fim de se aproximar de um modelo animal de Síndrome Alcoólica Fetal, os pesquisadores tem utilizado um modelo em que é feita uma exposição aguda de etanol no dia gestacional oito, período crítico de organogênese e crescimento neuronal fetal (Endres et al., 2005; Webster, Walsh, Lipson, & McEwen, 1980).

A determinação da dose de álcool a ser administrada no período pré-natal no modelo animal continua sendo discutida entre os pesquisadores, visto que a quantidade de álcool a ser

consumida nesse período é o fator determinante do estudo (Jacobson & Jacobson, 1994). A maneira mais confiável de controlar a administração do etanol é fazer a determinação dos níveis de álcool no sangue da mãe (West & Goodlett, 1990; West, Goodlett, Bonthius, Hamrc, & Marcussen, 1990). Um dos principais critérios de diagnóstico da SAF em animais é a redução do crescimento fetal ou baixo peso ao nascer (Hannigan, Abel, & Kruger, 1993). Baixo peso ao nascer pode ser causado por diferentes insultos durante o período pré-natal, mas existem evidências de que o álcool por si só é capaz de causar déficit no desenvolvimento fetal em modelos animais (Hannigan, 1996). É consenso entre pesquisadores que o período gestacional de exposição ao álcool é determinante nos prejuízos ocasionados. Isso ocorre tanto para humanos como também em modelos animais, por exemplo, malformações da face e crânio, são mais propensas a ocorrerem, principalmente quando ocorre ingestão de álcool no primeiro trimestre gestacional, pois o sistema nervoso central parece ser mais sensível aos efeitos deletérios do álcool nessa fase (Coles, 1994; Coles & Miller, 1992; West & Goodlett, 1990).

Uma das mais importantes descobertas feitas através de modelos animais foi que aspectos nutricionais da exposição pré-natal ao álcool são inseparáveis dos efeitos teratogênicos (Abel & Hannigan, 1995; Dreosti, 1993; Falconer, 1990; Schenker et al., 1990). Esses estudos demonstraram que dietas inadequadas podem exacerbar os efeitos do álcool e confirmam que o álcool pode diretamente e/ou indiretamente comprometer o estado nutricional da mãe e do feto. Deficiência em proteínas, carboidratos, vitaminas ou minerais podem interferir no desenvolvimento e maturação do feto (Weinberg, D'Alquen, & Bczio, 1990; Wiener, Shoemaker, Koda, Bloom, & 1981, 1981). Em ratos, a atenuação da deficiência nutricional associada com a administração do álcool na gestação pode limitar a teratogenicidade (Dreosti, 1993). Um estudo recente demonstrou que a deficiência protéica durante o período gestacional

pode mudar o comportamento do animal em determinados modelos de ansiedade (Cabral & Almeida, 2008).

Dos diversos efeitos que podem ser causados pela ingestão de etanol durante o período pré-natal, ainda não está bem documentado na literatura os efeitos do etanol na maturação, desenvolvimento e no comportamento dos descendentes de mães que fizeram uso de álcool sob doses moderadas no período gestacional. Mesmo porque, quando um agente em particular é classificado como um teratógeno é difícil estabelecer uma “dose segura” para ser administrado (Sandler, 1980). Um estudo analisou crianças nascidas de mães que utilizaram etanol diariamente (mais de dois “drinks”) no período pré-natal e mostrou que essas crianças apresentam um retardo no crescimento até os dois anos de idade e diminuição de peso até os oito meses, quando comparada com crianças filhas de mães que não consumiram álcool no período gestacional. A diferença na estatura das crianças ficou evidente até os 36 meses de vida. O estudo ainda mostrou que a diferença não foi devida à deficiência nutricional das mães (Jacobson, Jacobson, & Sokol, 1994). Na literatura existem vários estudos clínicos mostrando os efeitos e consequências da exposição pré-natal ao álcool, principalmente quanto se trata da SAF, (Konovalov, Kovetsky, Bobryshev, & Ashewell, 1997; Sigh & Snyder, 1982), entretanto, crianças de mães que consumiram álcool durante a gravidez, na maioria das vezes, não atingem todos os critérios para diagnóstico da SAF, mas mesmo assim, sofrem com os prejuízos permanentes ocasionados nos diferentes processos do SNC (Chappell, Margret, Li, & Waters, 2007).

O consumo de álcool pode gerar também desnutrição, que por si só seria deletéria para o desenvolvimento. A desnutrição alcoólica pode acontecer porque o etanol substitui as calorias de uma dieta equilibrada em nutrientes e sais minerais por calorias chamadas de “vazias”, ou seja,

que não são aproveitadas para o crescimento físico do feto e não são acompanhadas de vitaminas e micronutrientes (Lieber, 1976). Isto resulta em prejuízo funcional da absorção, digestão e nos processos de detoxicação. Por ação tóxica direta o álcool causa insuficiência pancreática e deficiência de enzimas intestinais, o que agrava o estado nutricional (Lieber, 1991). A desnutrição é um problema particular nos estudos experimentais de exposição pré-natal ao álcool devido ao aumento do requerimento de nutrientes imposto pela unidade de crescimento fetal-placentária.

A fase gestacional em que a mãe faz o uso de etanol pode influenciar nos prejuízos ocasionados. Na gestação humana o terceiro trimestre é caracterizado por um período de rápido crescimento e proliferação neuronal. Estudos clínicos sugerem que o terceiro trimestre é um período particularmente sensível do desenvolvimento do SNC (Riley, Barron, Melcer, & Gonzales, 1993). Esses estudos mostraram que crianças cujas mães utilizaram etanol durante a gestação, mas pararam a ingestão alcoólica antes do terceiro trimestre mostraram-se mais saudáveis do que as crianças cujas mães ingeriram etanol durante toda a gravidez.

Modelo Animal de Exposição Pré-Natal

Na literatura existem vários estudos clínicos mostrando os efeitos e consequências da exposição pré-natal ao álcool, principalmente quanto se trata da SAF, (Konovalov et al., 1997; Sigh & Snyder, 1982) no entanto, poucos estudos com animais têm procurado investigar o papel desta droga durante o período gestacional e seus efeitos no desenvolvimento dos filhotes após o nascimento e durante a idade juvenil (Abel & Dintcheff, 1978; Da Silva, Ribeiro, & Masur, 1980; Driscoll et al., 1990).

Roedores servem como um bom modelo experimental para o metabolismo humano e eventos da fase gestacional. Muito do que se sabe sobre a SAF e os efeitos de exposição pré-natal ao álcool são resultado de trabalhos em modelos animais. O uso destes modelos tem contribuído para a compreensão dos mecanismos que levam às alterações morfológicas e comportamentais de fetos expostos ao álcool, assim como tem sugerido algumas ações de prevenção da SAF (Santos, Biscaro, Santos, & Moraes, 2009). Os estudos utilizando animais permitem ao pesquisador ter um controle maior de certas variáveis difíceis de serem controladas em experimentos com humanos - tempo e nível de exposição à droga, dieta e condições de vida idênticas nos grupos experimentais, controle de ingestão, etc. (Driscoll et al., 1990; Hannigan, 1996). De um modo geral, o modelo animal de exposição pré-natal ao álcool já confirmou diferentes prejuízos visto em casos clínicos em humanos, como baixo peso e malformações de órgãos e do crânio (Hannigan, 1996; Riley, 1990). Além disso, podem-se realizar avaliações da prole em procedimentos que não seriam éticos nos estudos humanos como avaliações neuro-anatômicas, maturacionais e avaliação de comportamento (Silva, 2000). Esses estudos são importantes a fim de serem utilizados como meios preventivos, demonstrando os efeitos de

drogas e fármacos no comportamento e no sistema nervoso central, além de oportunizar pesquisas de novos fármacos que possam vir a auxiliar o tratamento clínico de pacientes que sofreram exposição pré-natal ao álcool (Shankar et al., 2007). Até agora, a maioria dos estudos dos efeitos da exposição crônica ao etanol, em ratos, por via oral, tem sido conduzida utilizando dietas líquidas contendo etanol como as desenvolvidas por Lieber e DeCarli (1989) ou também por gavagem (Kapetanovic et al., 2006). Para administração aguda é utilizado o método de injeção intraperitoneal (Ciccocioppo et al., 1999).

Dieta Líquida com Etanol

Controles adequados e ajustes na dieta impõem desafios significativos em estudos de exposição pré-natal ao álcool. A via de administração é outra consideração importante quando as adaptações biocomportamentais que ocorrem em resposta à administração da droga a ser avaliada. A dieta líquida foi uma maneira encontrada para que os animais consumissem o etanol oralmente, sem estresse e sem dor, visto que ao dar a escolha para o animal, ele tende a escolher a água ao invés do álcool. Essa dieta, originalmente descrita por Lieber e colaboradores em 1963 contém todos os nutrientes necessários para manter uma dieta balanceada, sendo que o grupo em tratamento terá uma parte dos carboidratos substituída pelo etanol (Preedy, McIntosh, Bonner, & Peters, 1996).

O álcool contém aproximadamente 7,2 Kcal/g, não podendo ser visto como uma substância alimentícia já que não fornece nenhum nutriente necessário para o organismo. Em parte, como resultado deste fornecimento de calorias, os bebedores crônicos não sentem fome, o

que pode facilmente conduzir a um déficit em proteínas, vitaminas, e microelementos. Por intermédio de modificações na estrutura e funcionamento do intestino, fígado e pâncreas, o álcool também perturba a digestão e absorção dos nutrientes, sendo que as maiores deficiências são em vitaminas e proteínas (Dreosti, 1993). Não é de hoje que se sabe que a nutrição da mãe no período gestacional é fundamental para o bom desenvolvimento da prole (Ferrari et al., 1992). Em 1987, Lancaster e colaboradores afirmaram que frequentemente mães alcoólatras não consomem uma dieta adequada de acordo com as demandas nutricionais do feto, complicando ainda mais os efeitos do etanol que se somam aos déficits nutricionais. Já em 1985, pesquisadores demonstraram que ratos alimentados cronicamente com dieta líquida contendo etanol como única fonte de alimento consumiram, não apenas menos calorias, mas também menos cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo e vitamina B6 do que o necessário para o desenvolvimento normal (Rao & Larkin, 1985).

A formulação da dieta líquida para ratos de Lieber e DeCarli constitui um importante avanço na pesquisa e nos efeitos biológicos do álcool (Sanchis, Sancho-Tello, & Guerri, 1988). A adição de etanol na água pode desencadear uma aversão ao etanol em roedores, que acabam consumindo uma quantidade mínima da solução. A administração do álcool na água acaba sendo uma limitação do estudo da administração de álcool por via oral, pois quanto menos o rato bebe água menos ele come ração, levando a desidratação e desnutrição do animal. A dieta líquida pode evitar essa limitação do estudo, visto que a água e os nutrientes diários necessários encontram-se todos num recipiente único.

Um problema importante e comum nas pesquisas com exposição pré-natal ao etanol tem sido o efeito anorexígeno do etanol resultando na deterioração do estado nutricional. A utilização do sistema animais pares-emparelhados - controle e tratado permitem que seja oferecida, aos

animais controle a quantidade ingerida no dia anterior pelo animal tratado. Este modelo tem sido utilizado quando se trata de exposição de roedores ao álcool por via oral, e assim, garante que ambos os grupos consumam a mesma quantidade de dieta líquida (Fiebre & Fiebre, 2003; Israel, Oporto, & Macdonalds, 1984; Uzbay & Kayaalp, 1995). Várias modificações e versões da fórmula da dieta líquida têm sido proposta para diferentes condições experimentais. Algumas dessas dietas têm sido elaboradas, especificamente, para ratas gestantes e lactantes (Sanchis et al., 1988). Atualmente, as dietas líquidas utilizadas contêm, além dos ingredientes básicos (carboidratos, proteínas e ácidos graxos), estabilizante, minerais, vitaminas, fibras e zinco.

Uma das maiores vantagens da técnica da dieta líquida é facilitar o sistema de pares-emparelhados, pois através dos tubos de alimentação graduados sabe-se a qualquer período do dia quanto o animal ingeriu. Outra vantagem da dieta líquida é a flexibilidade de ajustes nutricionais, ou seja, nutrientes específicos podem ser adicionados no preparo de acordo com as necessidades do experimentador. Além desses fatores a condição da administração por via oral reduz o estresse sendo um meio muito menos invasivo do que os métodos de gavagem ou injeção intraperitoneal (Lieber & DeCarli, 1989).

Desenvolvimento Pós-Natal

Em longo prazo, a exposição ao álcool no período gestacional pode causar danos no desenvolvimento do sistema nervoso, baixo peso do neonato e frequentemente levam a prejuízos cognitivos e comportamentais. Animais expostos ao etanol no período gestacional exibem prejuízos em respostas reflexas, atraso motor e alteração no desenvolvimento córtico-espinhal.

Estruturas cerebrais como cerebelo, locus caeruleus e o córtex somatosensorial parecem serem as mais afetadas (Chappell et al., 2007).

Em ratos, o terceiro trimestre gestacional ocorre após o nascimento, ou seja, o período pós-organogênese é extrauterino, o que é uma limitação dos estudos em teratogenia que utilizam esta espécie. Para o rato, o período embriogênico compreende, aproximadamente, os primeiros 7-10 dias e o período fetal do dia 11 ao dia do parto. Sendo os 7-10 primeiros dias de vida pós-natal o período que representa o equivalente terceiro trimestre da gestação humana e compreende o período de maior crescimento neuronal (Weinberg, Sliwowska, Lan, & Hellemans, 2008). Em embriões de camundongos, por exemplo, a exposição ao etanol durante a gastrulação (dia gestacional sete) causou principalmente uma alta incidência de malformações craniofaciais incluindo hipoplasia maxilar e mandibular. No entanto, embriões tratados com etanol pouco tempo depois, na fase de neurulação (dia gestacional 10) exibiram principalmente defeitos na formação do tubo neural e defeitos na formação dos membros. E quando exposto no período pós-organogênese foi observado retardo do crescimento e prejuízo neuronal (Giles, Boehm, Brogan, & Bannigan, 2008).

A gestação da rata difere da gestação humana, principalmente, quanto ao período gestacional. O período perinatal da rata pode ser dividido em quatro etapas: implantação, organogênese desenvolvimento fetal e período neonatal. O início da prenhes que vai da fertilização até a implantação, é um período crítico durante o qual podem ocorrer perdas gestacionais. Os processos celulares que ocorrem durante o período perifertilização (meiose, ovulação e fertilização) são similares em roedores e em humanos (Castro, Destefani, Diniz, & Poli, 2007). O período neonatal, que é a fase final do período perinatal, tem seu início no nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. Nesse período ocorre a

maturação funcional e ganho de peso corporal. Por outro lado, o ambiente inicial do neonato é determinado pela mãe que é responsável pela sobrevivência do filhote. A mãe, que é a primeira fonte de conforto térmico, alimentação e limpeza, determina primariamente o desenvolvimento dos sistemas fisiológicos de modulação do comportamento no neonato; o que por sua vez influencia o desenvolvimento da arquitetura do cérebro após o nascimento (Castro, 2006).

Em animais, podem-se utilizar alguns testes para avaliar o desenvolvimento e o comportamento pós-natal dos filhotes. Os testes são importantes para determinar se há alteração quanto ao peso, desenvolvimento, maturação e comportamento dos filhotes pela exposição pré-natal ao álcool. Entre vários estudos de exposição pré-natal, um estudo de Abel e colaboradores demonstrou que filhotes expostos ao álcool durante o período gestacional, nasceram com peso e tamanho inferiores aos seus controles não expostos à droga, sendo o efeito dose-dependente. Mostrou também que quanto maior a dose de álcool administrada, menor é o consumo de água e ração e maior o número de óbitos (Abel & Dintcheff, 1978).

1.1.1. Desenvolvimento Pós-Natal em Ratos

Ratos de laboratório nascem pesando entre 5-7 g no dia zero. Uma vez que são lambidos até serem totalmente limpos pela mãe e estabelecem uma respiração estável, eles assumem uma coloração avermelhada, sem pêlos e com a camada epidérmica extremamente espessa, sendo visível através do corpo. A camada epidérmica do filhote é tão espessa que o leite pode ser visto na região abdominal. O neonato nasce com os olhos fechados e a cavidade do ouvido obstruída por pele. Uma inspeção mais minuciosa revela que as narinas estão abertas para a respiração e eles possuem dentes de leite, mas os dentes incisivos ainda não nasceram. As patas traseiras e

dianteiras são bem formadas, mas os filhotes recém-nascidos não conseguem ficar em pé, agarrar ou engatinhar (Gerrish & Alberts, 1995).

O desenvolvimento pós-natal é muito rápido (ganham 20 g até o dia 10, 30 g até o dia 15 de vida). A cada dia a aparência dos filhotes sofre mudanças. O ganho e peso é considerado o melhor indicador do estado de saúde do filhote e frequentemente detectam mudanças que não são reveladas por testes observacionais do desenvolvimento. Ocorre um aumento regular na massa muscular, no crescimento e diferenciação do esqueleto do animal, acompanhado de um suporte antigravitacional para sustentação dos movimentos. Por volta do dia 5 ocorre um aumento tecido adiposo subcutâneo, fornecendo um maior isolamento térmico, além do aparecimento de pêlos ao longo do corpo. No dia 10 o filhote já está coberto de pêlos, embora a pelagem só esteja completa após três semanas de idade (Gerrish & Alberts, 1995). Por volta do dia 10 a ponta da orelha separa-se da cabeça e desenrola; por volta do dia 12 abre-se o meato auditivo externo (Whishaw & Kolb, 2005).

No nascimento, parte do sistema sensorial está funcional, mesmo a parte funcional ainda não estando completa. Os filhotes desenvolvem respostas a estímulos e aumentam o nível de sensibilidade pouco a pouco, aumentando a capacidade de discriminação e cognição (Alberts, 1984). O desenvolvimento das funções sensoriais ocorre segundo uma sequência na seguinte ordem para todos os vertebrados: tátil, vestibular, auditiva e visual (Alberts, 1984). A função tátil no neonato está presente apenas em algumas regiões do corpo. A função vestibular pode ser demonstrada com testes de reflexos. Neonatos apresentam reflexo de postural logo no dia 1, embora se torne mais evidente com a idade. A geotaxia (reflexo de virar 180° a partir da posição inicial) tem sido considerada uma das respostas reflexas mais características dos ratos (Kreider & Blumberg, 2005).

Já no dia 2 o filhote é capaz de exercer o reflexo de orientação dorso-ventral, visto quando o filhote é posicionado de costas em uma superfície plana. Os filhotes, com o passar do tempo, desenvolvem estratégias para a reorientação dorso-ventral a fim de facilitar o seu desempenho (Whishaw & Kolb, 2005).

Começam a utilizar a postura quadrúpede por volta do dia 10. Primeiramente eles começam engatinhando (dia 10 e 11). Conseguindo caminhar a partir do dia 12 e correr a partir do dia 15. O comportamento de “grooming” começa a ocorrer quando o animal já é capaz de assumir posição vertical, por volta do dia 18 pós-natal (Moore & Rogers, 1984).

A atividade locomotora dos filhotes aumenta de maneira gradual do dia 1 até o dia 12. Então, há um salto de 10 vezes na atividade, sendo o pico por volta dos dias 19 e 20 de vida (Whishaw & Kolb, 2005).

Um estudo recente demonstrou que a utilização de álcool na gestação pode ocasionar desordens de ansiedade nas futuras crianças e adultos quando comparados com gestantes controles que não ingeriram álcool no período gestacional (Hellemans et al., 2008).

A fim de observar o desenvolvimento, a maturação e o comportamento dos filhotes expostos ao álcool durante o período gestacional, utilizou-se uma bateria de testes que compreendem respostas reflexas, de orientação, de força, atividade locomotora e ansiedade, além do registro de peso, abertura dos olhos e erupção dos dentes.

Na arcada dentária de roedores encontramos quatro dentes incisivos e doze molares, não encontramos caninos nem pré-molares, apresentando uma anatomia oral simples, quando comparada com a humana. Na morfologia dentária dos ratos os dentes são atravessados por fissuras profundas e possuem uma camada fina de esmalte que não cobre a ponta das cúspides

(parte externa do dente junto ao esmalte). No ato da erupção dentária essa camada de esmalte ainda é pouca mineralizada, especialmente na base e partes laterais das fissuras (Thylstrup & Fejerskov, 2001). Após a erupção os dentes dos roedores são hipomineralizados e a manutenção pós-eruptiva pode continuar por até dois meses após a erupção (Edwardsson, 1988). Os incisivos dos ratos têm sua erupção entre os dias 7-10 após o nascimento (Thylstrup & Fejerskov, 2001). A erupção dos incisivos dos roedores tem sido estudada, experimentalmente, desde o século passado para pesquisas de desenvolvimento dos dentes associado a diferentes fatores (Schour, 1934). Um estudo realizado na universidade UNICAMP de São Paulo demonstrou os efeitos do etanol e sugeriu que a ingestão de álcool durante a gestação, interfere com a expressão do Fator Epidermal de Crescimento (EGF) durante os estágios iniciais da amelogênese e na secreção e maturação do esmalte. Ratas foram expostas a concentrações crescentes de etanol na água (1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%) (v/v) alteradas semanalmente. Na sétima semana elas acasalaram e seguiram tomando a concentração de 25% até o final da gestação. Nos dias 0,4º e 9º pós-natal os filhotes foram sacrificados para a análise mandibular (Sant'anna, 2001).

Observação de Reflexos

1.1.2. Geotaxia Negativa

A Geotaxia Negativa é um teste que remete à função vestibular e à propriocepção. Robergs & Roberts (2002), descrevem que o aparelho periférico consiste de um conjunto de sensores do movimento, as quais enviam informações ao sistema nervoso central, especificamente ao complexo nuclear vestibular e ao cerebelo, sobre a velocidade angular da

cabeça, a aceleração linear e a orientação cefálica em relação ao eixo gravitacional. O sistema nervoso central processa esses sinais e os combina com outras informações sensoriais, para estimar a orientação cefálica. A resposta do sistema vestibular central é transmitida aos músculos extra-oculares e à medula espinhal para preparar dois importantes reflexos, o reflexo vestibulo-ocular e o reflexo vestibulo-espinhal. O reflexo vestibulo-ocular gera os movimentos oculares, os quais permitem uma visão nítida enquanto a cabeça está em movimento, o reflexo vestibulo-espinhal gera o movimento corporal de compensação, objetivando manter a estabilidade cefálica e postural, e, dessa forma, evitar quedas. O desempenho destes reflexos é monitorizado pelo sistema nervoso central e, quando necessário, eles são reajustados por processos adaptativos (Robert & Scott, 2002).

1.1.3. Reflexo Postural e Reflexo de Agarrar

Do ponto de vista neurológico, o desenvolvimento sensório-motor adquire importância vital na avaliação evolutiva da maturidade da função motora. A função motora delinea-se por meio de três sistemas que interagem entre si: piramidal, extrapiramidal e cerebelar. O sistema piramidal é responsável pelo movimento voluntário. O sistema extrapiramidal é aquele que se ocupa da motricidade automática, fornecendo a adaptação motora básica a diversas situações. O sistema cerebelar é o sistema regulador do equilíbrio e da harmonia, controla tanto os movimentos voluntários quanto os involuntários (Robert & Scott, 2002).

A integração dos três sistemas motores determina a atividade muscular que, por sua vez, tem basicamente duas funções: a) a função cinética ou clônica, e b) a função postural ou tônica. A primeira corresponde ao movimento propriamente dito e a segunda está ligada aos estados de tensão e distensão fásica do músculo, que estão na origem do movimento. Esse conjunto de

sistemas e funções forma o aparelho motor, sua preparação e execução, o que, indubitavelmente, outorga à motricidade um valor instrumental e mecânico em si (Whishaw & Kolb, 2005).

A partir do nascimento existe uma sequência de desenvolvimento maturacional que segue a seguinte ordem: tátil, vestibular, acústica e visual. No neonato a função tátil está presente apenas em algumas regiões como a região perioral, anogenital e nas patas. Os neonatos demonstram reflexo postural (com a idade torna-se mais robusto) no dia 1, a primeira reorientação do filhote colocado em decúbito dorsal para decúbito ventral é demorada, podendo levar até um minuto. Com o passar dos dias, ocorre uma melhora nas estratégias posturais e o animal torna-se mais rápido na realização da tarefa (Whishaw & Kolb, 2005).

O rato desenvolve a habilidade de “agarrar”, entre o dia 14 e o dia 17 pós-natal. A força muscular despendida também pode ser testada através de testes de força, onde o animal deve ser capaz de sustentar por um determinado tempo o peso do seu próprio corpo.

Questão de Pesquisa

A exposição pré-natal ao álcool teria um efeito direto no desenvolvimento fetal? Este efeito dependeria da dose ingerida durante a gestação? Existiria uma dose “segura” de etanol a ser ingerida durante a gestação? Estas perguntas serão testadas, determinando se a exposição pré-natal de ratas prenhes ao álcool, sob diferentes doses, poderia provocar prejuízos no desenvolvimento da prole.

Esse trabalho faz parte de um projeto maior que tem por objetivo investigar os efeitos da exposição pré-natal ao álcool na atenção, visto que mães que utilizaram álcool durante a gestação têm maiores chances dos seus filhos apresentarem Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade – TDAH na idade infantil (Linnet et al., 2003). O presente trabalho descreve a primeira etapa de investigação que visou avaliar o desenvolvimento, maturação e comportamento da prole.

Objetivos

Objetivo Geral

O estabelecimento de um possível efeito da exposição pré-natal ao etanol sobre o desenvolvimento da prole requer primeiramente um estudo da dose de etanol a ser utilizada. Desse modo, o presente trabalho pretende verificar os efeitos de diferentes doses de etanol, no desenvolvimento, maturação e comportamento de filhotes cujas mães foram expostas ao álcool no período pré-natal.

Objetivos Específicos

1. Verificar se a exposição pré-natal ao etanol a uma dose que produz toxicidade, equivalente a SAF, produziria prejuízos mensuráveis no desenvolvimento e comportamento da prole por meio de uma bateria de testes de desenvolvimento, maturação e comportamento (Estudo 1- Piloto).

2. Verificar se exposição pré-natal ao etanol, em doses abaixo daquelas que produzem toxicidade equivalente a SAF produz prejuízos mensuráveis no desenvolvimento e

comportamento da prole por meio de uma bateria de testes de desenvolvimento, maturação e comportamento (Estudo 2).

Materiais e Métodos

Estudo 1 (Piloto)- Efeitos no desenvolvimento e maturação de filhotes expostos à 44% de calorias derivadas do etanol durante o período pré-natal.

Sujeitos

Os sujeitos foram as ninhadas provenientes de ratos Lister Hooded (60 fêmeas e 18 machos) em idade reprodutiva para os acasalamentos (45-60 dias) obtidos da colônia mantida no biotério central da UFRGS. Os acasalamentos foram feitos na proporção de duas fêmeas para um macho. Após o acasalamento, as ratas foram examinadas para a presença de espermatozóide na secreção vaginal, em caso de confirmação esse dia foi considerado o dia gestacional um. As ratas foram alocadas individualmente em caixas de polipropileno com cama de maravalha. O dia do parto foi considerado o dia pós-natal 1 – DPN1. As ninhadas foram mantidas com as respectivas mães até o desmame (DPN22). A temperatura e umidade foram controladas (21-23°C; 40-60%) bem como o ciclo claro/escuro que respeitou o horário de 12 horas claro (7:30 – 19:30) e 12 horas escuro (19:30 às 7:30). As ninhadas foram avaliadas do 1º até 22º dia de vida através dos

testes de desenvolvimento, maturação e comportamento. É importante observar que alguns desses animais morreram antes de completar sete dias de vida.

1.1.4. Droga e Instrumentos

Foi utilizada uma dieta líquida - pó para preparação de dieta líquida para ratas gestantes (Bioserv®, NJ, EUA) e álcool etílico PA 95% (Fmaia®).

Segundo o fabricante (BioServ®) a análise do pó seco da dieta para adicionar etanol contém 27% de proteínas, 28% de ácidos graxos e 24% de carboidratos. E para o pó seco da dieta Controle contém 17% de proteínas, 18% de ácidos graxos e 53% de carboidratos. Juntamente ao pó seco foram adicionados 44% de todas as calorias da dieta em etanol.

Foram necessários 48 tubos de alimentação especiais para dieta líquida, com capacidade para 150 mL (Bioserv, NJ). Juntamente com os tubos, foram utilizados 48 grampos de alumínio, especificamente adaptados para prender os tubos de alimentação na caixa das ratas expostas ao etanol. E ainda, três provetas com capacidade para 100 mL e 1000 mL, liquidificador tipo industrial e garrafas de acondicionamento de 1L foram necessários no preparo das dietas.

Para os testes foram necessários um aparato para o teste de força de agarrar, consistido de uma barra cilíndrica de metal (20 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro) acoplada a dois pilares de madeira de 25 cm de altura, com uma superfície fofa na parte inferior (Maurissen, Marable, Andrus, & Stebbins, 2003).

Para o reflexo postural foi necessário cronômetro e uma superfície macia (toalha) (C. D. Cook, Biddlestone, Coop, & Beardsley, 2006).

O aparato para o teste de geotaxia negativa consiste de um bloco triangular de madeira, com altura de 20 cm e comprimento de 35 cm, com inclinação de 30° (Whishaw & Kolb, 2005).

Para o teste do campo aberto (*open field*), utilizou-se uma arena circular de plástico, com diâmetro de 60 cm, e paredes transparentes na altura de 40 cm (Insight®). O chão da arena é dividido em quadrantes de tamanhos iguais e de acordo com a distância em relação ao centro.

1.1.5. Procedimentos

Para a definição dos grupos experimentais, primeiramente, as ratas fêmeas adultas foram pesadas. A fim de estabelecer um grupo experimental e um grupo controle par-emparelhado as ratas foram sendo separadas por semelhança de pesos. Por exemplo: rata 1A44% pesou 225 g e a rata 1C44% 224g. Dessa forma, cada rata teve seu par-emparelhado como controle individual.

As ratas foram alocadas nos seguintes grupos experimentais:

Álcool 44% (A44) → Grupo tratado com dieta líquida e etanol

Controle 44% (C44) → Grupo controle da dieta líquida

Chow → Grupo com dieta sólida - ração de biotério (Nuvilab®)

Além desses grupos, foram separados mais dois grupos, com outra dose, um tratado e um controle par-emparelhado, no entanto, não obtiveram sucesso nos acasalamentos e por isso foram descartados do experimento. Sendo assim, para a análise dos dados posteriores teremos três grupos, com 12 animais cada um.

Animais do grupo tratado e do grupo controle receberam alimentação emparelhada (*pair-feeding*), quantidades idênticas de dieta administradas para ambos os animais emparelhados a

fim de controlar a exposição a possíveis moduladores nutricionais. Um segundo grupo controle, denominado Chow, recebeu acesso contínuo à água e à ração padrão do biotério (Nuvilab®) de modo que se o grupo tratado com álcool diferisse destes grupos controle e os grupos controle não diferissem entre si, os efeitos observados não serão devido à limitação da ingestão alimentar ou à dieta líquida, mas devido ao álcool (Driscoll et al., 1990). Devido ao pequeno número de animais o grupo Chow foi formado com ratas jovens (45 dias).

O grupo tratado (A44) dispunha como única fonte de nutrientes uma dieta líquida baseada na formulação proposta por Lieber e Decarli (1989) utilizando a concentração de 100 mL de álcool (concentração 95%) por litro, fazendo com que as dietas do grupo álcool tivessem 44% de suas calorias derivadas do etanol (Barbier et al., 2009). As dietas foram administradas ad libitum para o grupo tratado (A44). O grupo controle da dieta líquida (C44) recebia diariamente a mesma quantidade ingerida pelo grupo tratado no dia anterior, a fim de manter os pesos dos animais emparelhados e não obter diferenças nutricionais. Todos os tubos com a dieta foram trocados diariamente entre 9-12h. As ratas do grupo Chow receberam ração de laboratório e água à vontade.

Os animais (grupo A44 e C44) receberam uma habituação à dieta líquida antes do início dos acasalamentos. Os animais do grupo C44 (n = 12) receberam durante oito dias 100 mL de dieta líquida sem adição de etanol e os animais pertencentes ao grupo A44 (n = 12) receberam durante oito dias uma habituação em concentrações crescentes de etanol até a concentração desejada. Conforme a tabela abaixo:

Tabela 1
Habituação ao Etanol

Habituação (dia)	Grupo	Concentração
1º	A44	40% Etanol 44% + 60% Controle (100 mL)
2º	A44	40% Etanol 44% + 60% Controle (100 mL)
3º	A44	60% Etanol 44% + 40% Controle (100 mL)
4º	A44	60% Etanol 44% + 40% Controle (100 mL)
5º	A44	80% Etanol 44% + 20% Controle (100 mL)
6º	A44	80% Etanol 44% + 20% Controle (100 mL)
7º	A44	80% Etanol 44% + 20% Controle (100 mL)
8º	A44	Etanol 44% (60 mL)

As ratas prenhes do grupo controle (n = 10) receberam diariamente dieta líquida controle de acordo com o volume ingerido, no dia anterior, pela rata respectiva do grupo tratado. E o grupo Chow recebeu ração e água à vontade.

A dieta líquida foi a única fonte de nutrientes para as ratas dos grupos A44 e C44 durante todo o período gestacional. Todas as manhãs entre 9 e 11h da manhã os tubos eram retirados das caixas moradia e substituídos por outros com dieta. Assim, o consumo era registrado através do tubo graduado e de forma a obter um controle individualizado. As ratas foram pesadas dia sim, dia não para manter um controle do peso corporal e acompanhamento da gestação.

1.1.6. Acasalamento

Após um período inicial de aclimação às caixas individuais e após a habituação à dieta líquida, as ratas receberam os machos para acasalamento à medida que apresentavam a fase estro ou pró-estro do ciclo estral. Pouco antes do início do ciclo escuro, entre as 17 e 18h o macho era colocado na caixa das fêmeas, mantendo uma proporção de duas fêmeas para um macho, evitando o acasalamento entre irmãos. Eles tiveram acesso somente a água durante esse período.

Na manhã do dia seguinte, entre 9 e 10h, era feita a coleta de secreção vaginal nas fêmeas. A análise do esfregaço vaginal em microscópio óptico revelava se havia a presença de espermatozóide na amostra a fim de confirmar o coito, e assim, retirar a rata do ciclo dos acasalamentos. Após a análise as ratas eram recolocadas em suas caixas moradia. As fêmeas não prenhes, caso ainda estivessem na fase de pró-estro ou estro do ciclo estral voltavam ao acasalamento no final do dia com um macho diferente. O acasalamento prolongou-se por seis semanas até que o número máximo de ratas apresentasse diagnóstico positivo para prenhes.

Pela manhã, após a retirada dos tubos de alimentação vazios, uma nova dieta era preparada e repostada nos tubos para serem novamente entregues para os animais. Ao longo do estudo piloto foram observados alguns sinais de desidratação em alguns animais do grupo tratado com álcool, e por isso, foi oferecida água em bebedouros de vidro por 5 minutos diariamente para todos os animais (Fiebre & Fiebre, 2003).

Todas as fêmeas foram verificadas diariamente (8:30-9h e 4:30-17h), a partir de três dias anteriores ao dia do parto previsto (dia pré-natal 19 até o dia pré-natal 24). O dia do parto era considerado o dia pós-natal DPN1. Partos realizados após as 17:30 eram pertencentes ao dia posterior. No DPN1 os filhotes de cada ninhada eram contados, sexados com base na distância anogenital, pesados e examinados individualmente para algum tipo de malformação física.

A administração das dietas prosseguiu até o fim da gestação (dia do parto). À medida que as ratas pariam, passavam a receber ração e água e água à vontade, evitando que o efeito do etanol passasse via amamentação. As ninhadas, sempre que possível, foram ajustadas em oito filhotes, procurando equilibrar o número de machos e fêmeas. Ao final do desmame, as ratas

expostas ao etanol foram sacrificadas na câmara de gás e as ratas controles e Chow foram realocadas para experimentos posteriores quando possível.

1.1.7. Testes de Desenvolvimento

A partir do 1º dia pós-natal (DPN1) até o desmame (DPN22), os filhotes foram manipulados diariamente. Durante a manipulação, foi observado o dia de incidência dos seguintes indicadores, conforme a tabela abaixo:

Tabela 2
Testes de Maturação, Desenvolvimento e Comportamento

Teste	Dia Pós Natal (DPN)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	34-60
Peso	X					X				X							X			
Reflexo Postural		X	X	X	X															
Erupção dos dentes incisivos							X	X	X	X										
Geotaxia negativa							X	X	X	X										
Abertura dos olhos											X	X	X	X						
Força de Agarrar													X			X				
Campo Aberto																		X	X	
Labirinto em Cruz Elevado																				X*

*O teste foi realizado apenas uma vez entre o DPN 34 e o DPN 60.

1.1.7.1. Peso

Os filhotes foram pesados ao nascer e a cada 7 dias até o desmame no 22º dia pós-natal como uma medida de desenvolvimento. As mães eram retiradas momentaneamente das caixas moradias e os filhotes eram pesados individualmente, no período da manhã, entre 9 e 11h.

1.1.7.2. Abertura dos Olhos

Os filhotes foram examinados para a abertura dos olhos que é esperada do 12º ao 14º dias de vida. A mãe era momentaneamente retirada da caixa moradia e um por um dos filhotes eram

examinados. Geralmente, a abertura ocorre em etapas, primeiramente nota-se uma fresta na região dos olhos. Posteriormente ocorre a abertura de um dos olhos e depois do outro. O experimentador anota 2- os dois olhos abertos, 1 – um olho aberto e 0 – nenhum olho aberto.

1.1.7.3. Erupção do Dente Incisivo

O início do aparecimento do dente incisivo é esperado entre o 7º e o 10º dia de vida dos filhotes. Os filhotes serão examinados individualmente, enquanto a mãe era retirada momentaneamente da caixa moradia. O experimentador segura um por um dos filhotes e força a abertura da boca com as mãos, observando o aparecimento do dente. Atribui-se 0 - não há aparecimento de nenhum dente, 1- aparecimento de vestígio inicial do dente, 2 - aparecimento nítido do dente através da gengiva.

1.1.7.4. Observação de Reflexos

A avaliação dos reflexos dos filhotes é realizada conforme a idade, sendo composta por três testes distintos:

1) Reflexo Postural

Do 2º ao 5º DPN o animal era colocado sobre uma mesa (revestida com uma superfície macia), em decúbito dorsal. Era registrado o tempo gasto para que volte à posição normal (decúbito ventral), com tempo máximo de um minuto (60s).

2) Força de Agarrar

No 14º e 17º dia pós-natal, os animais foram colocados no aparato de avaliação da resposta de agarrar. Os filhotes são pegos pelo rabo e encorajados,

individualmente, a agarrar-se com as duas patas dianteiras na barra cilíndrica, ficando suspensos por no máximo 20 segundos. Foram feitas duas tentativas, em que será cronometrado o tempo que o animal conseguiu ficar suspenso.

3) Geotaxia Negativa

No 7º, 8º, 9º e 10º dia pós-natal os animais foram colocados com as quatro patas sobre um plano inclinado de 30º, com a cabeça virada para o lado mais baixo desta; o reflexo é considerado formado se o animal girar seu corpo a 180º, se reorientando em até um minuto (60s).

1.1.8. Testes de Comportamento

1.1.8.1. Campo Aberto

Os animais foram testados no aparato “campo aberto” (*open field*) no DPN21 e DPN22 de acordo com o protocolo utilizado por (Gilbertson & Barron, 2005) para análise da atividade locomotora. Cada animal foi posicionado no centro da arena e avaliado por 5 min. Antes do teste de cada animal a arena foi devidamente desinfetada com álcool 70%. O teste consistiu na mensuração das variáveis comportamentais dos filhotes aos 21 e 22 dias de idade. Foram analisadas as categorias comportamentais: atividade exploratória (caracterizada pela locomoção total e permanência no centro), “rearing” (permanecer sobre duas patas traseiras investigando o ambiente, no centro do campo aberto ou nas laterais), auto-limpeza ou “grooming” (número de vezes que o animal utiliza as patas dianteiras para limpeza). A tarefa foi realizada em dois dias

consecutivos (intervalo exato de 24 horas). O primeiro dia foi considerado o dia do treino e o segundo dia foi considerado o dia do teste (Azevedo, 2005).

1.1.9. Análise dos Dados

Os dados do estudo piloto foram analisados apenas por estatística descritiva através da média \pm erro padrão da média (EPM), visto que o número de ninhadas foi insuficiente para realizar os demais testes estatísticos.

Estudo 2 - Efeitos no desenvolvimento, maturação e comportamento de filhotes expostos à 10 e 26% de calorias derivadas do etanol durante o período pré-natal.

1.1.10. Sujeitos

Os sujeitos foram as ninhadas provenientes de ratos Lister Hooded (93 fêmeas e 31 machos) em idade reprodutiva (45-60 dias) para os acasalamentos, que foram obtidos da colônia mantida no biotério central da UFRGS. Os acasalamentos foram feitos na proporção de três fêmeas para um macho. As ratas foram alocadas individualmente em caixas de polipropileno com cama de maravalha no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. O dia do parto foi considerado o dia pós-natal 1 – DPN1. Todos os filhotes foram mantidos com as respectivas mães até o desmame (DPN22). A temperatura e umidade foram controlada (21-23°C; 40-60%) bem como o ciclo claro/escuro que respeitou o horário de 12 horas claro (7:30 – 19:30) e 12 horas escuro (19:30 às 7:30). As ninhadas foram avaliadas do 1º até 22º dia de vida através dos testes de desenvolvimento, maturação e comportamento.

1.1.11. Droga e Instrumentos

Foi utilizada uma dieta líquida - pó para preparação de dieta líquida para ratas gestantes (Bioserv®, NJ, EUA) e álcool etílico PA 95% (Fmaia®) ou maltodextrina.

O pó seco para dieta líquida foi o mesmo utilizado no Estudo 1- Piloto, no entanto com diferentes percentuais calóricos derivados do etanol, 10 e 26% respectivamente.

A cada litro de dieta do grupo A10, foram adicionados 63,1 g de maltodextrina e a cada litro de dieta do grupo A26, adicionamos 22,7 g de maltodextrina.

As ratas foram habituadas a dieta líquida durante seis dias da seguinte maneira. No primeiro dia, os animais receberam $2/3$ de dieta Controle + $1/3$ de dieta com álcool. Nos três dias seguintes, receberam $1/2$ álcool + $1/2$ dieta Controle. Nos dois dias seguintes, receberam $2/3$ dieta com álcool, equivalente a $1/3$ de dieta Controle. E a partir do 6º dia, comeram somente dieta álcool. Todas as ratas receberam 90 mL de dieta líquida colocados no bebedouro, no entanto, considerou-se uma margem de 5 a 10 mL que ficavam inacessíveis no fundo do bebedouro.

Foram necessários 93 tubos de vidro especiais para dieta líquida, com capacidade para 150 mL (Bioserv, NJ). Juntamente com os tubos, foram necessários grampos de alumínio, especificamente adaptados para prender os tubos de alimentação nas caixas das ratas expostas ao etanol. E ainda, três provetas com capacidade para 100 mL, liquidificador tipo industrial e garrafas de acondicionamento de um litro foram necessários no preparo das dietas.

Segundo o fabricante (BioServ®) em cada mililitro de dieta líquida contém uma caloria. A fim de controlar e manter o peso dos animais de forma saudável administrou-se 90 mL de dieta líquida diariamente para todos os grupos que receberam dieta líquida - controles e álcool - (Decarli & Lieber, 1967).

Para análise de implantes uterinos foram necessário material cirúrgico e os anestésicos Tiletamina e Zolazepan.

Para os testes de desenvolvimento foram necessários um aparato para o teste de força de agarrar, consistido de uma barra cilíndrica de metal (20 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro)

acoplada a dois pilares de madeira de 25 cm de altura, com uma superfície fofa na parte inferior (Maurissen et al., 2003).

Para o reflexo postural foi necessário cronômetro e uma superfície macia (toalha) (C. D. Cook et al., 2006).

O aparato para o teste de geotaxia negativa consiste de um bloco triangular de madeira, com altura de 20 cm e comprimento de 35 cm, com inclinação de 30° (Whishaw & Kolb, 2005).

Para o teste campo aberto (*open field*), utilizou-se uma arena circular de plástico, com diâmetro de 60 cm, e paredes transparentes na altura de 40 cm (Insight®). O chão da arena é dividido em quadrantes de tamanhos iguais e de acordo com a distância em relação ao centro.

Para o teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*) foi utilizado um aparato em cruz, feito de madeira, elevado 50 cm do chão, todo na cor preta, consistindo de quatro braços (50 X 10 cm), dois fechados por paredes de 50 cm de altura e dois abertos, elevados (Walf & Frye, 2007).

Para as pesagens foi utilizado-se uma balança eletrônica semi-analítica (Kern®).

1.1.12. Procedimentos

Ratas Lister Hooded com idade reprodutiva foram devidamente alojadas no biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) em caixas individuais. Elas dispunham como única fonte de nutrientes uma dieta líquida baseada na formulação proposta por Lieber e Decarli (1989). Foram utilizadas doses de 18,5 mL e 48,75 mL de álcool (Etanol P.A. 95%) por litro, equivalente a 10% e 26% de calorias derivadas do álcool, respectivamente. Também foram utilizadas dietas controle – dieta líquida sem a presença do álcool – as dietas líquidas dos grupos

álcool receberam maltodextrina como adjuvante calórico, de maneira a tornar a dieta líquida do grupo tratado isocalórica às dietas do grupo controle. As dietas líquidas foram administradas na quantidade de 90 mL/dia, através de tubos de alimentação especificamente adaptados para o uso de dietas líquidas. Todas as dietas foram trocadas diariamente sendo a única fonte de ingestão calórica dos animais.

As ratas foram alocadas em caixas individuais em cinco grupos experimentais, sendo dezoito ratas por grupo, cujas siglas representam o grupo exposto ao álcool (A) ou grupo controle (C), além da dose a que foram submetidas (10% ou 26% de calorias derivadas do álcool): grupo A10, grupo A26, grupo C10 e grupo C26, mais um grupo de comparação que consumiu ração e água à vontade no decorrer do experimento, denominado grupo Chow.

Álcool 26% (A26)	}	Grupos tratados com dieta líquida e etanol
Álcool 10% (A10)		
Controle 26% (C26)	}	Grupos controle da dieta líquida
Controle 10% (C10)		
Chow	}	Grupo com dieta sólida - ração de biotério (Nuvilab®)

Os grupos tratados e controles foram emparelhados por peso e por idade no primeiro dia do estudo a fim de manter os grupos controles e tratados como pares-emparelhados, no entanto devido ao atraso nos resultados dos acasalamentos não foi possível seguir com o

emparelhamento. Por isso, todos os animais receberam diariamente 90 mL de dieta líquida nas doses de 10 ou 26% das calorias derivadas do etanol ou de dieta líquida controle. Dose esta, que, segundo a literatura seria uma quantidade aconselhada para manutenção do peso e saúde dos animais (Israel et al., 1984; Uzbay & Kayaalp, 1995).

Após um período inicial de quinze dias de aclimação ao biotério, as fêmeas foram alojadas nas caixas dos machos para acasalamento, à proporção de três fêmeas para um macho, durante o ciclo escuro. Elas tiveram acesso à água e ração de laboratório durante esse período. Na manhã do dia seguinte, elas foram realocadas em suas caixas moradia novamente. Nesse período, realizou-se o lavado vaginal para a verificação da presença de espermatozóides no canal vaginal e, sob confirmação via microscópio óptico, conseqüente retirada do ciclo de acasalamentos. O acasalamento seguiu-se por 60 dias, sendo então suspenso, a fim de evitar uma diferença de idade muito grande entre o primeiro e o último nascimento. Na última semana antes de completar os 60 dias dos acasalamentos as fêmeas do grupo A26 foram deixadas por cinco dias consecutivos na caixa dos machos a fim de aumentar o número de fêmeas prenhes nesse grupo. Durante esse período as fêmeas não tiveram acesso à dieta líquida,

A administração das dietas teve início uma semana antes dos acasalamentos (período de habituação à dieta líquida) e prosseguiu até o final da gestação. E à medida que as ratas pariam a dieta era substituída por ração de laboratório e água à vontade.

Durante a lactação as caixas moradias foram checadas diariamente para observação do canibalismo maternal e mortalidade pós-natal. Ao final do desmame, as ratas mães expostas ao etanol foram sacrificados na câmara de gás no CREAL-UFRGS (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório), e dispostos conforme o CFMV (Conselho Federal

Medicina Veterinária), segundo o artigo 16, alínea “f” da Lei nº 5.517, de outubro de 1968 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

1.1.13. Implantes Uterinos

Após o período de gestação, cinco fêmeas (uma de cada grupo: A10, A26, C10, C26, e Chow) foram eutanasiadas com uma super dosagem do anestésico Tiletamina + Zolazepan. Através de incisão no abdômen o útero foi transferido para uma placa de vidro com soro fisiológico, sendo exposto e dissecado. O conteúdo uterino foi avaliado, contabilizando-se o número de fetos íntegros e reabsorvidos, respeitando a ordem que se apresentavam no útero, iniciando pelo corno uterino direito e finalizando no corno uterino esquerdo (Santos et al., 2009).

1.1.14. Análise dos níveis de álcool no sangue

Passadas três semanas do período de acasalamento, duas ratas de cada grupo do álcool que não emprenharam ou que não levaram a gestação à termo ou que perderam seus filhotes por qualquer razão, foram sacrificadas, e o sangue foi coletado para análise do nível sanguíneo de etanol. Além destas a fim de determinar o nível de etanol sanguíneo das ratas do Estudo 1, duas ratas não prenhes foram submetidas à uma dieta líquida com 44% das calorias derivadas do etanol por 22 dias (equivalente ao período gestacional). As amostras foram coletadas 3 horas após o início do ciclo escuro, período em que se encontra o maior pico de concentração de etanol no sangue de ratas expostas à essa dieta líquida (Mothes, Optiz, Werner, & Clausing, 1996) e também porque os roedores são animais noturnos e costumam estar mais ativos e alimentarem-se mais durante o ciclo escuro (Whishaw & Kolb, 2005). A quantidade ingerida foi registrada através do tubo graduado de dieta líquida no momento da coleta do sangue do animal. O tempo de exposição ao álcool na dieta líquida foi referente a todo período gestacional (22 dias). As

fêmeas foram todas pesadas no dia da coleta. O método de eutanásia utilizado foi a guilhotina, seguido de coleta de 4 mL de sangue total em cubetas contendo EDTA. As amostras foram conservadas no gelo até posterior análise realizada pelo laboratório de análises clínicas Toxilab pelo método de Cromatografia gasosa (dcg/L).

1.1.15. Testes de Desenvolvimento

A partir do 1º dia pós-natal os filhotes foram testados seguindo o protocolo de testes de desenvolvimento.

A partir do 1º dia pós-natal (DPN1) até o desmame (DPN22), os filhotes foram manipulados diariamente, a fim de observar o dia de incidência dos indicadores maturacionais e a realização dos testes de desenvolvimento conforme a tabela e a descrição já anteriormente mostradas na Tabela 2 (Estudo 1- Piloto).

1.1.16. Testes de Comportamento

A fim de analisar o comportamento dos filhotes foram realizados os testes do campo aberto (*Open Field*) e do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*) que visam analisar a atividade locomotora e a ansiedade dos animais respectivamente. Para o Campo Aberto foi utilizado o protocolo já descrito anteriormente no item 4.1.6 (Estudo 1- Piloto)

1.1.16.1. Labirinto em Cruz Elevado

Para a análise do comportamento de risco e de ansiedade nos filhotes foi realizada a Tarefa labirinto em cruz elevado (*elevated plus maze*) entre os dias 34 e 60 de vida. Descrito originalmente por Pellow e colegas (1985) o labirinto em cruz elevado (LCE) é construído em um plano elevado, distante cerca de 1m do piso, na forma de uma cruz, sendo dois de seus braços

cercados por paredes altas (50 cm) – braços fechados (BF) e os outros dois braços destituídos de paredes – braços abertos (BA). Os ratos foram posicionados no centro do labirinto de frente para um dos braços abertos. Foi avaliado durante 5 minutos o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados. Registrou-se o tempo total gasto no braço aberto e no braço fechado, sendo considerado uma entrada quando o animal entrar com as quatro patas em um dos braços. Nesse paradigma, o número total de entradas pode ser compreendido como uma medida da atividade locomotora e exploratória e – o principal em relação ao LCE- postula-se que a preferência do animal pelo braço aberto (aferida tanto pelo número total de entradas neste, como também quanto ao tempo transcorrido neste e a proporção neste em relação ao braço fechado) relaciona-se inversamente proporcional à ansiedade do animal. O labirinto foi desinfetado com álcool 70% após a testagem de cada animal. A tarefa é feita apenas uma vez e tem duração de 5 minutos para cada animal (Walf & Frye, 2007). Nessa tarefa os parâmetros foram analisados conforme Graeff e colaboradores (1994). Existem dois grupos de fatores que devem ser analisados nessa tarefa, um deles indicará sobre a ansiedade e o outro sobre a atividade locomotora no aparato. No primeiro fator está descrito sobre o braço aberto: o número de entradas, o tempo gasto, a percentagem do número de entradas, a percentagem do tempo gasto e o número de respostas de risco realizadas. Sendo todas essas respostas indicativas da ansiedade dos animais. Já o segundo fator está incluído no número de entradas nos braços fechados, número de entradas totais (nos dois braços) e o número de respostas de orientação (*rearings*). Sendo essas respostas indicativas da atividade locomotora dos animais.

1.1.17. Análise Estatística dos Dados

Os dados gráficos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e analisado pela - ANOVA de duas vias de medidas repetidas ou ANOVA de uma via (labirinto

em cruz elevado e Campo Aberto), seguido pelo teste de Bonferroni ou Tukey, quando $p < 0,05$. Em casos de violação da esfericidade assumida foram utilizado os ajustes de Greenhouse-Geisser para o grau de liberdade. O software SPSS 16.0 foi utilizado para as análises. Resultados foram considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$. O número amostral (n) refere-se ao número de ninhadas utilizadas na análise dos dados.

No caso dos filhotes terem morrido e não terem completado os testes nos devidos dias, as células da planilha do SPSS foram deixadas em branco (*missing cases*).

Resultados

Estudo 1- Piloto

Como mostra a Tabela 3 o número de ninhadas do grupo Chow foi relativamente pequeno com relação aos demais grupos. Isso se deve, em parte, à idade das ratas que se pertenciam a esse grupo. A fim de completar o grupo controle padrão (Chow) foram utilizadas ratas com 45 dias, idade em que a recém teria ocorrido a abertura do canal vaginal (desenvolvimento sexual), sendo essas ratas muito jovens para o acasalamento (Whishaw & Kolb, 2005). Duas das fêmeas prenhes desse grupo não levaram a gestação à termo.

Foram seis ninhadas mortas no grupo A44 e quatro ninhadas no grupo C44. No entanto, no grupo Chow nenhuma das ninhadas foram canibalizadas, mas duas ratas não levaram a gestação a termo. A tabela abaixo apresenta um delineamento experimental do estudo piloto.

Tabela 3
Controle de acasalamentos do Estudo 1- piloto

Grupo	A 44%	C 44%	Chow	Total
Número de ratas que acasalaram por grupo (n)	12	12	12	36
Número de fêmeas prenhes	10	10	5	25
Número de ninhadas estudadas	4	6	3	13
Número de filhotes estudados	31	29	23	83
Número de ninhadas canibalizadas ou mortas	6	4	2	12
Mortalidade dos filhotes (%)	60	40	20	48

Conforme a Tabela 4 o aumento de peso que as ratas apresentaram durante todo o período gestacional foi realizado o seguinte cálculo: Peso máximo – Peso DG1, ou seja o peso máximo que a rata atingiu durante a prenhes que coincidiu, para todas as ratas, no dia anterior ao dia do parto subtraído do peso que a rata obteve no primeiro dia da prenhes.

O cálculo da ingestão alcoólica diária foi calculado em g/Kg/dia, para isso foi necessário saber que em um litro de dieta líquida há 80 g de etanol, como as ratas ingeriram em média 24 mL de dieta líquida diariamente, foi consumido 1,92 g etanol/24 mL de dieta líquida. Considerando o peso médio dessas ratas 220g, para obter o resultado em Kg, foi multiplicado 1,92 g por 4,55 (1000g/220g) obtendo 8,72 g etanol/Kg/dia.

Tabela 4
Controle de peso e ingestão alcoólica do Estudo 1

Grupo	A 44%	C 44%	Chow
Peso médio das fêmeas no Dia Gestacional 1 (DG1) (g)	159	154	149
Peso médio (ratas) durante a gestação (g)	248	203	222
Aumento médio de peso durante a gestação (g)	89	54	68
Quantidade de etanol ingerida durante a gestação (g/Kg/dia)	7-9	n/a	n/a
Média de ingestão de dieta líquida diária (mL)	24	24	n/a

Tabela 5

Tabela de resultados de desenvolvimento, maturação e comportamento do estudo piloto

Teste	DPN	A44%		C44%		Chow	
		Média	EPM*	Média	EPM	Média	EPM
Peso	1	5,34	0,11	5,09	0,12	5,53	0,11
	6	10,17	0,31	9,86	0,33	11,85	0,32
	11	16,45	0,44	17,36	0,46	21,23	0,44
	18	26,65	0,51	26,68	0,54	29,20	0,52
Reflexo Postural	2	27,99	2,11	23,48	2,52	9,96	3,37
	3	25,28	3,25	22,95	3,88	12,22	5,18
	4	14,67	2,75	15,05	3,29	5,55	4,39
	5	6,35	1,67	10,98	1,99	2,65	2,66
Geotaxia Negativa	7	49,20	2,81	24,38	2,88	19,56	3,29
	8	30,82	2,73	19,12	2,81	21,23	3,20
	9	34,46	3,47	15,23	3,56	20,06	4,07
	10	25,42	2,35	9,01	2,42	10,75	2,76
Força de Agarrar	14	6,72	0,84	10,28	0,88	10,86	1,01
	17	13,74	0,76	15,96	0,79	16,11	0,91
Abertura dos Olhos	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	13	0,42	0,13	0,40	0,13	0,05	0,15
	14	0,68	0,16	0,59	0,17	0,62	0,19
	15	1,26	0,13	1,57	0,14	1,91	0,16
Erupção dos Incisivos	7	0,02	0,06	0,20	0,06	0,17	0,07
	8	0,66	0,11	1,02	0,11	0,39	0,13
	9	1,03	0,14	1,41	0,14	0,95	0,16
	10	1,84	0,11	1,84	0,11	1,08	0,12
	14	1,92	0,10	1,84	0,10	1,08	0,12
Campo aberto (<i>Rearing</i>)	19	5,61	0,66	6,31	0,68	1,25	1,29
	20	4,81	0,68	4,62	0,70	7,63	1,34
	21	5,32	0,64	3,97	0,66	6,88	1,26
Campo aberto (<i>Grooming</i>)	19	2,13	0,29	2,14	0,30	7,50	0,57
	20	1,52	0,30	2,93	0,31	2,25	0,60
	21	2,55	0,61	5,59	0,63	2,00	1,20
Campo aberto (Tempo no centro)	19	47,17	5,91	31,61	6,11	30,35	11,64
	20	46,03	10,40	49,51	10,76	39,00	20,48
	21	30,56	3,09	22,76	3,19	22,00	6,08
Campo aberto (Cruzamentos)	19	22,32	2,59	36,66	2,68	35,75	5,09
	20	32,10	3,76	36,66	3,89	46,25	7,40
	21	27,55	2,54	28,34	2,63	37,25	5,00

*EPM = erro padrão da média

Os dados descritivos fizeram-se necessários devido ao pequeno número amostral (n) de ninhadas sobreviventes, principalmente no grupo Chow, inviabilizando a análise estatística paramétrica.

Conforme demonstra a Tabela 5 o peso dos filhotes dos grupos A44 e C44 foram semelhantes ao longo de todo o período de monitoramento, entretanto o grupo Chow, a partir do DPN6 mostrou-se mais pesados que os demais grupos, mantendo a diferença até o final do período (DPN 22).

Quanto aos reflexos, (postural, reorientação e força de agarrar) o grupo Chow apresentou média maior que o grupo A44. No reflexo postural, o grupo Chow parece desenvolver esse tipo de reflexo antes do grupo A44 e C44. Na geotaxia negativa e força de agarrar, o grupo A44 parece ser mais atrasado que os grupos C44 e Chow.

A erupção dos incisivos e a abertura dos olhos referem-se à maturação dos animais e seguem uma escala de 0 à 2, sendo que “2” seria os dois olhos abertos ou o aparecimento dos incisivos. Na abertura dos olhos não parece haver diferença na média, no entanto, na erupção dos incisivos, interessante, o grupo A44 e C44 apresentaram média superior ao grupo Chow.

A tarefa do Campo aberto tem como principal objetivo avaliar a atividade locomotora dos filhotes. Quanto ao número de cruzamentos no DPN19 o grupo A44 fez o menor número de cruzamentos entre quadrantes, parecendo ter sua atividade alterada, quando comparado com os demais grupos. O grupo Chow foi o que fez a menor média para *rearings* e maior média para *groomings* enquanto o grupo A44 foi o grupo que permaneceu mais tempo no centro do aparato.

Estudo 2

O número de filhotes que nasceram mortos ou foram mortos ao longo dos primeiros dias de vida pós-natal mostrou-se mais incidente nos grupos A10 (54,7%) e no grupo A26 (51,2%), sendo a mortalidade nos grupos controles e Chow bastante semelhante entre si, conforme apresenta a Tabela 6 a seguir.

Tabela 6
Incidência de morte pós-natal do Estudo 2

	A10%	C10%	A 26%	C26%	Chow	Total
Total de ninhadas	7	6	16	7	8	44
Total de filhotes	53	48	84	52	39	276
Total de filhotes estudados	24	38	41	41	30	174
Total de filhotes mortos	29	10	43	11	9	102
% mortalidade dos filhotes	54,7	20,8	51,2	21,1	23	36,9

Como descrito na tabela a seguir o “peso máximo” que a rata atingiu durante o período gestacional foi considerado, para todas as ratas, o dia anterior ao dia do parto, e foi subtraído do peso que a rata obteve no primeiro dia gestacional. Sendo assim, o aumento médio de peso durante a gestação foi semelhante para todos os grupos, considerando a maior diferença entre os grupos tratados com a dieta líquida e o grupo Chow tratado com ração sólida.

Tabela 7
Controle de peso e ingestão alcoólica do Estudo 2

Grupo	A10%	A26%	C10%	C26%	Chow
Peso médio das fêmeas no dia gestacional 1 (g)	225	241	244	236	205
Média do peso máximo (ratas) durante a gestação (g)	284	310	306	291	255
Aumento médio de peso durante a gestação (g)	59	69	62	55	50
Quantidade de etanol ingerida durante a gestação (g/Kg/dia)	5,44	14,08	n/a	n/a	n/a
Média de ingestão de dieta líquida diária (mL)	90	90	90	90	n/a

1.1.18. Análise dos Implantes Uterinos

De acordo com os procedimentos apresentados no item 4.2.4 de Materiais e Métodos pode-se verificar os seguintes resultados:

- (Chow) - 2 implantes uterinos
- (A26) - 13 implantes uterinos (fotos abaixo)
- (C10) - sem implantes
- (A10) - sem implantes
- (C26) - implantes uterinos (somente no corno direito)

1.1.19. Teste do Reflexo Postural

Foram verificados em quanto tempo (latência) os filhotes foram capazes de retornar à posição de decúbito ventral. O teste foi realizado nos dias 2, 3, 4 e 5 pós-natal.

Observou-se um efeito principal do fator grupo ($F(4,38) = 4,56$; $p < 0,004$), em que o teste *post-hoc* Bonferroni demonstrou que o grupo Chow diferiu dos demais grupos com exceção do C26. Os grupos tratados e C10 apresentaram média de tempo superior para completar a tarefa). Houve também um efeito principal no fator sexo ($F(1,38) = 4,82$; $p < 0,034$), pois as fêmeas levaram mais tempo para realizar a tarefa do que os machos (Figura 2).

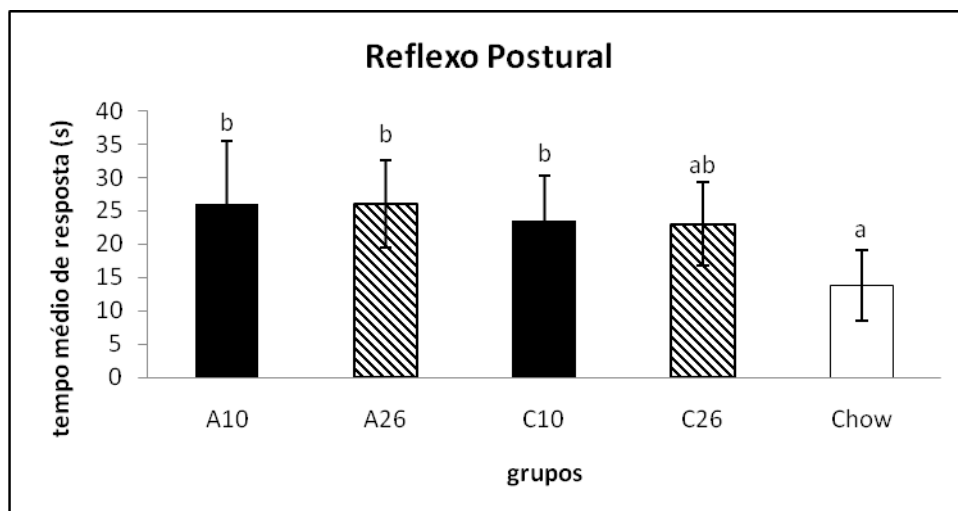


Figura 1. Média (\pm EPM) da latência de resposta dos filhotes até o retornar à posição de decúbito ventral nos DPN 2, 3, 4, e 5. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – GLM - medidas repetidas, n(ninhadas)= 7(A10), 16(A26), 6(C10), 7(C26), 8(Chow). As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Bonferroni $p < 0,05$).

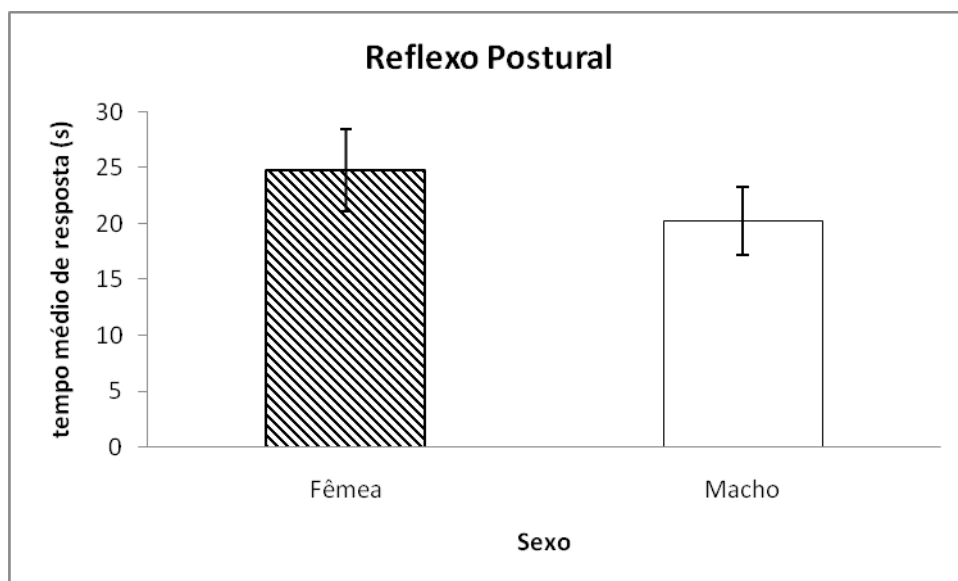


Figura 2. Média (\pm EPM) da latência de resposta dos filhotes machos e fêmeas até o retornar à posição de decúbito ventral nos DPN 2, 3, 4, e 5. ANOVA – GLM - medidas repetidas, sendo 23 machos e 25 fêmeas.

1.1.20. Peso

A fim de analisar o desenvolvimento dos filhotes, eles foram pesados periodicamente nos dias 1, 6, 11 e 18 pós-natais.

Observou-se um efeito linear do fator dia sobre o peso ($F(3,102) = 621,66; p < 0,001$), demonstrando que todos os animais foram ganhando peso normalmente conforme o seu desenvolvimento com o passar dos dias (Figura 3). Não foram observadas interações entre os fatores dia, grupo e sexo.

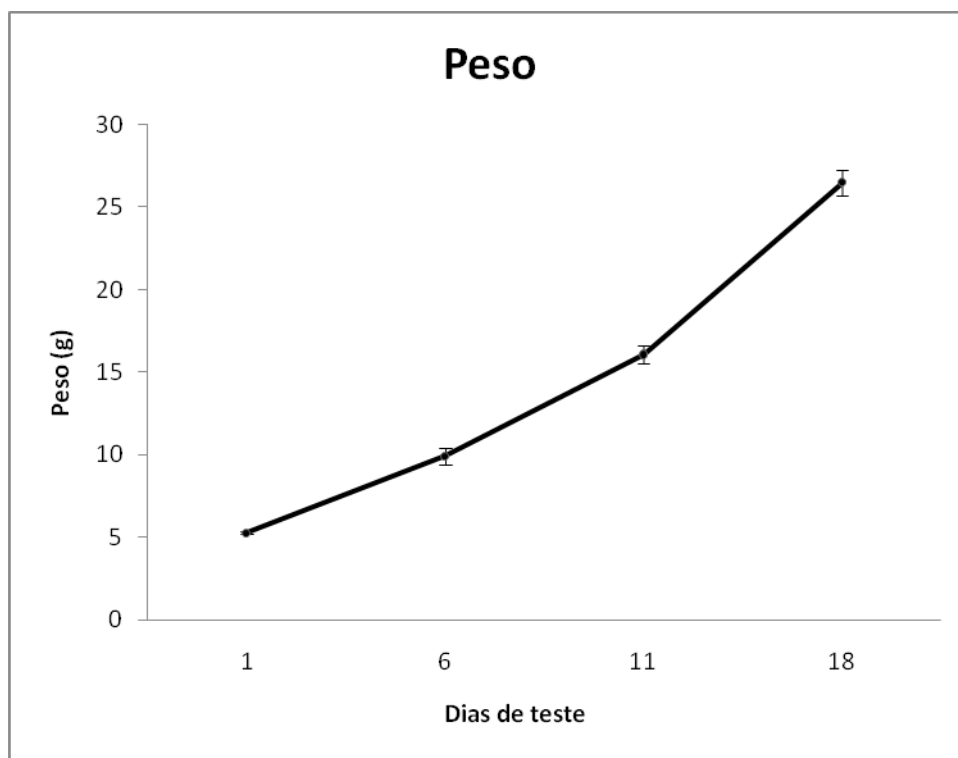


Figura 3. Média (\pm EPM) do peso de todas as ninhadas ($n=44$) DPN 1, 6, 11 e 18, avaliados pelo peso (g). ANOVA – GLM - medidas repetidas.

1.1.21. Teste Geotaxia Negativa

Foi analisado o tempo gasto pelos filhotes para efetuar a reorientação espacial. O teste foi realizado nos dias 7, 8, 9, e 10 pós-natais.

Não houve efeito do fator grupo, mas observou-se uma interação entre os fatores dia e grupo ($F(12,114) = 2,219$; $p < 0,015$). A diminuição do tempo ocorre linearmente com o passar dos dias ($F(3,114) = 26,42$; $p < 0,001$), entretanto, isso parece menos pronunciado no grupo, Chow, pois desde o DPN7 estas ninhadas apresentaram um tempo de resposta menor (Figura 4).

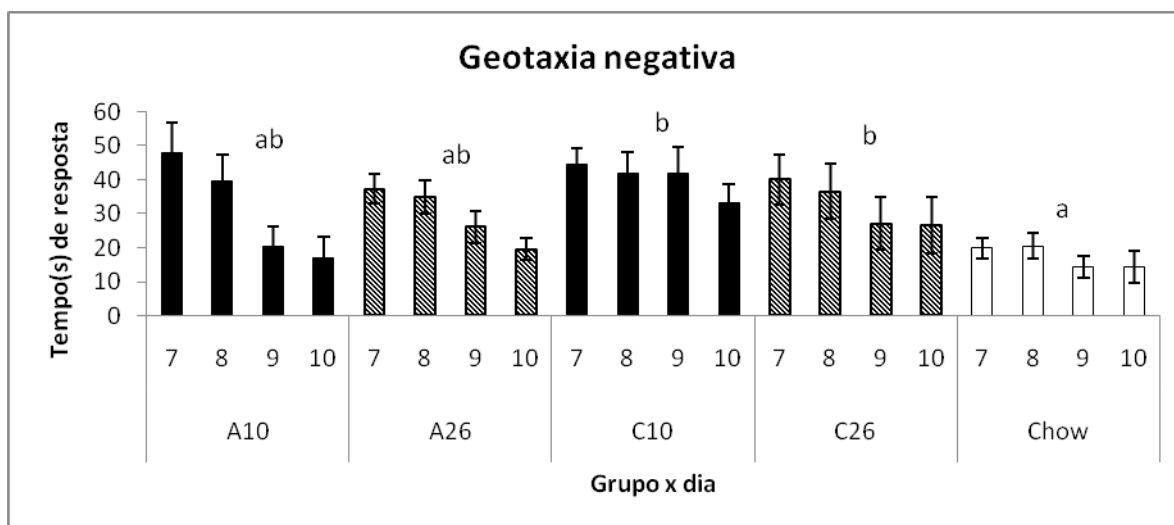


Figura 4. Média (\pm EPM) do reflexo de reorientação das ninhadas nos DPN 7, 8, 9 e 10, avaliados pelo teste de geotaxia negativa. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA - GLM, medidas repetidas, $n(\text{ninhadas}) = 7(\text{A10}), 16(\text{A26}), 6(\text{C10}), 7(\text{C26}), 8(\text{Chow})$. As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Bonferroni $p < 0,05$).

1.1.22. Teste de Força de Agarrar

Analisou-se o tempo máximo que o animal foi capaz de ficar suspenso pelas patas dianteiras agarrando-se a uma barra cilíndrica metálica. O teste foi realizado no dia 14 e 17 pós-natal.

Observou-se um efeito principal do dia sobre a média do tempo de força de agarrar a barra ($F(1,37) = 106,82$; $p < 0,001$), visto que esse tempo de suspensão na barra aumenta linearmente no segundo dia de teste em todos os grupos. Também foi observado um efeito principal de grupo ($F(4,37) = 7,90$; $p < 0,001$) em que o teste de Bonferroni demonstrou que o grupo Chow foi diferente de todos os demais grupos, exceto o grupo C26. O grupo C26 difere de A10 e C10, ou seja, os grupos Chow e C26 permaneceram mais tempo suspensos à barra que os demais grupos (Figura 5).

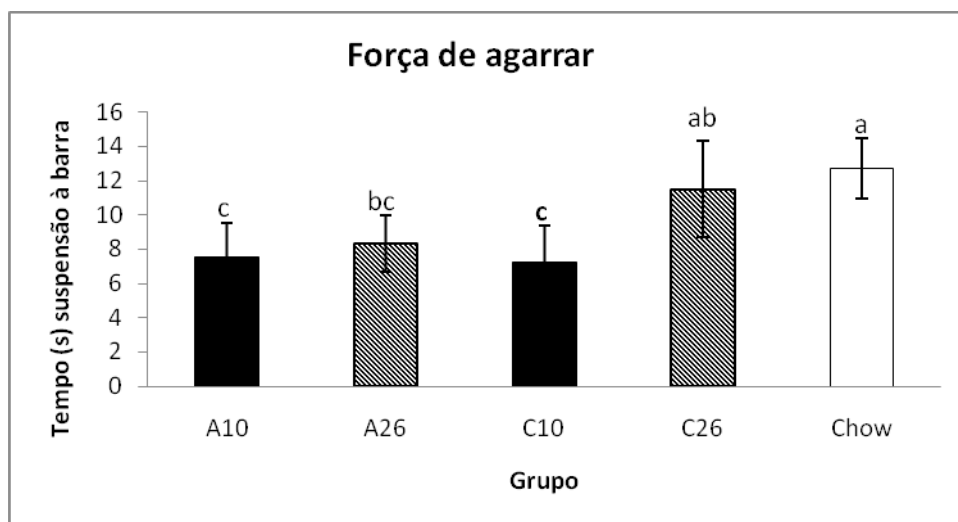


Figura 5. Média (\pm EPM) da força muscular das patas dianteiras das ninhadas. Foram avaliados nos DPN 14 e 17 pela contagem do tempo de suspensão na barra. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA - GLM, medidas repetidas, $n(\text{ninhadas}) = 7(\text{A10}), 16(\text{A26}), 6(\text{C10}), 7(\text{C26}), 8(\text{Chow})$. As letras, “a, b e c” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Bonferroni $p < 0,05$).

1.1.23. Erupção do dente Incisivo e abertura dos olhos

Durante os DPN 7, 8, 9 e 10 os filhotes foram observados para o aparecimento dos dentes através da erupção gengival do dente incisivo. Sendo considerado “2” quando os dentes já

apareciam nitidamente, “1” para quando se percebia os dentes através da gengiva e “0” para quando não era observado o aparecimento dos dentes incisivos.

Foi observado um efeito linear do fator dia, ($F(3,114) = 90,69$; $p < 0,001$), demonstrando um efeito ontogenético ao longo dos dias para todos os grupos. Foi observado também um efeito principal do fator grupo ($F(4,38) = 3,80$; $p < 0,01$), em que o teste de Bonferroni demonstrou que os grupos Tratados (A10 e A26) diferem dos grupos controles (Chow, C10), de forma que os grupos álcool parecem ter um atraso na erupção dos incisivos (Figura 6).

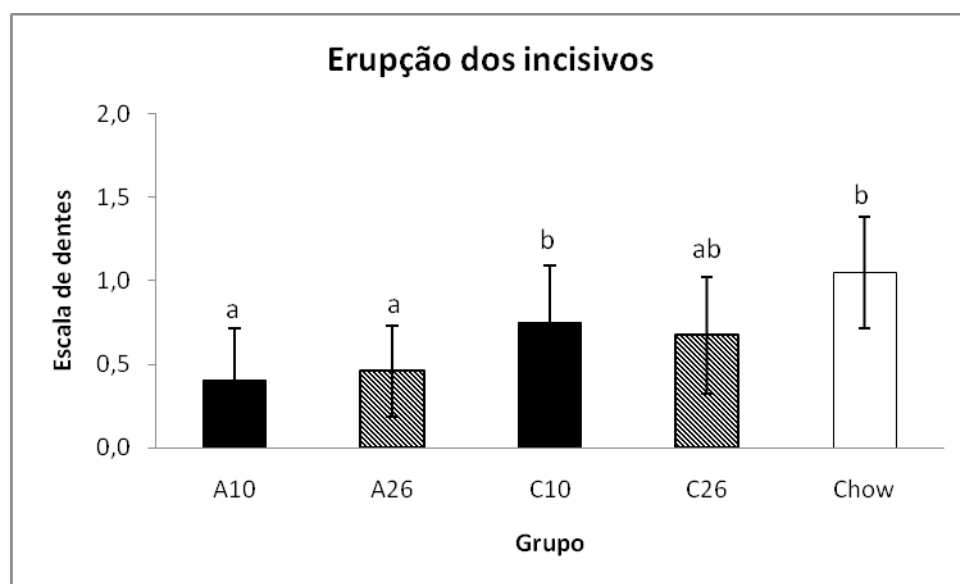


Figura 6. Média (\pm EPM) da erupção dos dentes incisivos das ninhadas nos DPN 7, 8, 9 e 10 avaliados pela observação da gengiva. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA - GLM, medidas repetidas, $n(\text{ninhadas}) = 7(\text{A10}), 16(\text{A26}), 6(\text{C10}), 7(\text{C26}), 8(\text{Chow})$. As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Bonferroni $p < 0,05$).

Os filhotes foram observados nos dias 12, 13, 14 e 15 pós-natais para a abertura dos olhos. Considerou-se “0” para nenhum dos olhos abertos, “1” para quando apenas um dos olhos estava aberto e “2” para quando os dois olhos já estavam abertos. No entanto não houve diferença estatística significativa neste teste.

1.1.24. Teste do Campo Aberto

Nessa tarefa foram analisados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos, número de respostas de orientação e de auto-limpeza e o tempo gasto nos quadrantes centrais.

Número de cruzamentos – Não foi observado efeito principal do fator grupo, embora o grupo A10, seguido do grupo A26, tenha apresentado maior número de cruzamentos entre quadrantes no campo aberto que os demais grupos (Figura 7). Não foi observada diferença quanto ao fator sexo nem interação deste fator com o fator dia ou grupo.

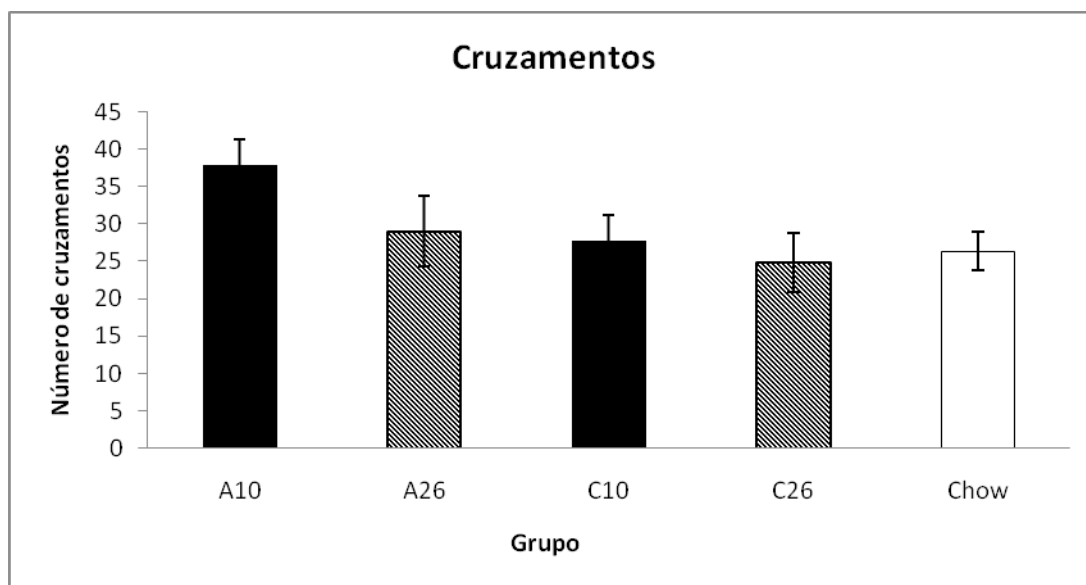


Figura 7. Média (\pm EPM) do número de cruzamentos no campo aberto. Avaliados pela contagem manual do número de cruzamentos realizados no aparato A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – Uma via, ($n= 5(A10)-10(A26)-10(C10)-10(C26)-9(Chow)$).

Número de respostas de reorientação - rearings: Foi observado um efeito principal do fator grupo ($F(4,43) = 11,67$; $p < 0,001$), sendo que o teste de Tukey demonstrou que o grupo C10 difere dos demais grupos. O primeiro dia que a tarefa foi realizada foi considerado o dia de

treinamento e o segundo dia, o teste. Observou-se uma diferença no número de rearings em cada dia. Sendo que a maioria dos grupos diminuiu o número de respostas no segundo dia.

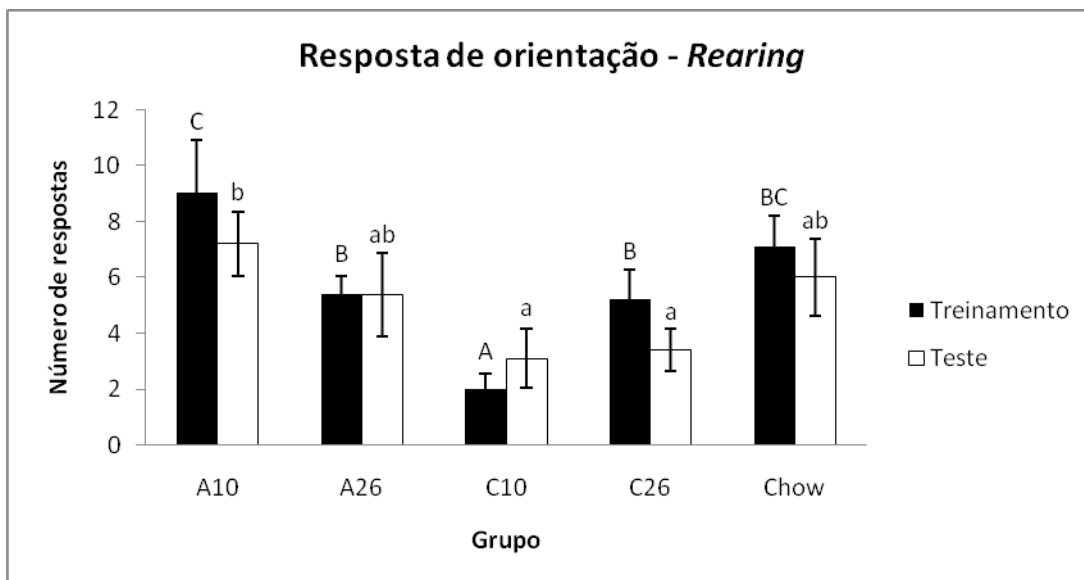


Figura 8. Média (\pm EPM) do número de *rearings* no campo aberto. Avaliado pelo número de vezes que o animal mantinha suspensa as duas patas dianteiras. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – Uma via, $n = 5(A10)-10(A26)-10(C10)-10(C26)-9(Chow)$. As letras, “a e b – A, B e C” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Tukey, $p < 0,05$).

Não foram observados resultados significativos quanto aos parâmetros de respostas de auto-limpeza e tempo gasto no centro do aparato.

1.1.25. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Nesta tarefa foram analisados os seguintes parâmetros: Número de respostas de reorientação (“*rearings*”), número de respostas de auto-limpeza (“*grooming*”), número de respostas de risco (“*risk assessment*”), número de entradas no braço aberto do aparato, número de entradas no braço fechado do aparato, tempo gasto no braço aberto e o tempo gasto no braço fechado.

Respostas de Risco: Observou-se um efeito principal de grupo ($F(4,38) = 8,63$; $p < 0,001$), em que o teste de Tukey demonstrou que o grupo A26 é diferente dos demais grupos, com exceção do grupo C26 (Figura 9).

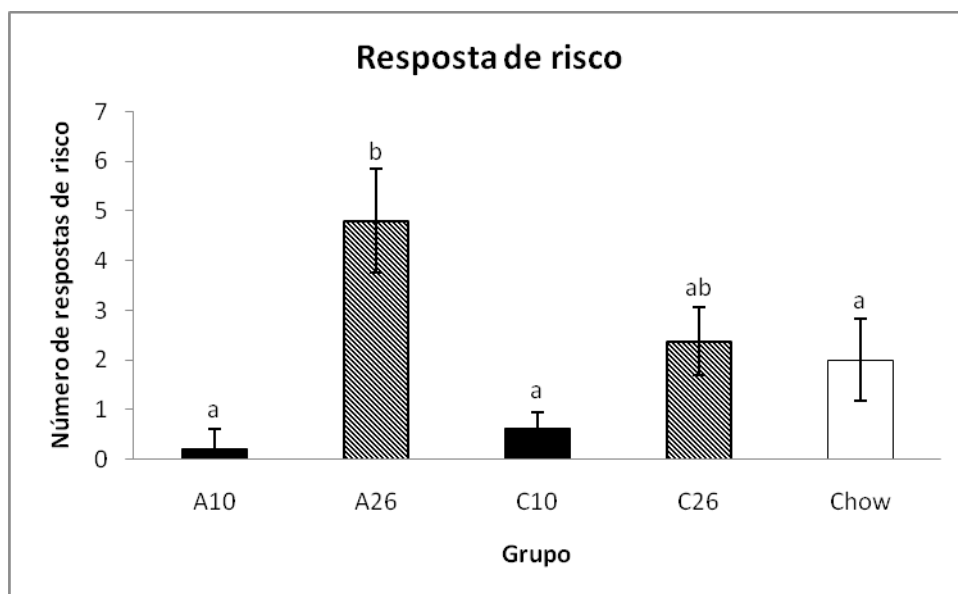


Figura 9. Número de respostas de risco (\pm EPM) das filhotes, avaliadas pela contagem manual do número de *risks* realizados no aparato após o DPN 35. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – de uma via - $n = 15(A10)-32(A26)-24(C10)-27(C26)-23(Chow)$. As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Tukey, $p < 0,05$).

Número de entrada nos braços aberto e fechado: Observou-se diferença entre grupos quanto ao efeito de entradas no braço aberto ($F(4,38) = 4,15$; $p < 0,01$) e no braço fechado ($F(4,38) = 4,89$; $p < 0,01$) em que o teste de Tukey demonstrou que o grupo A26 apresentou o maior número de entradas tanto no braço aberto como no braço fechado (Figura 10).

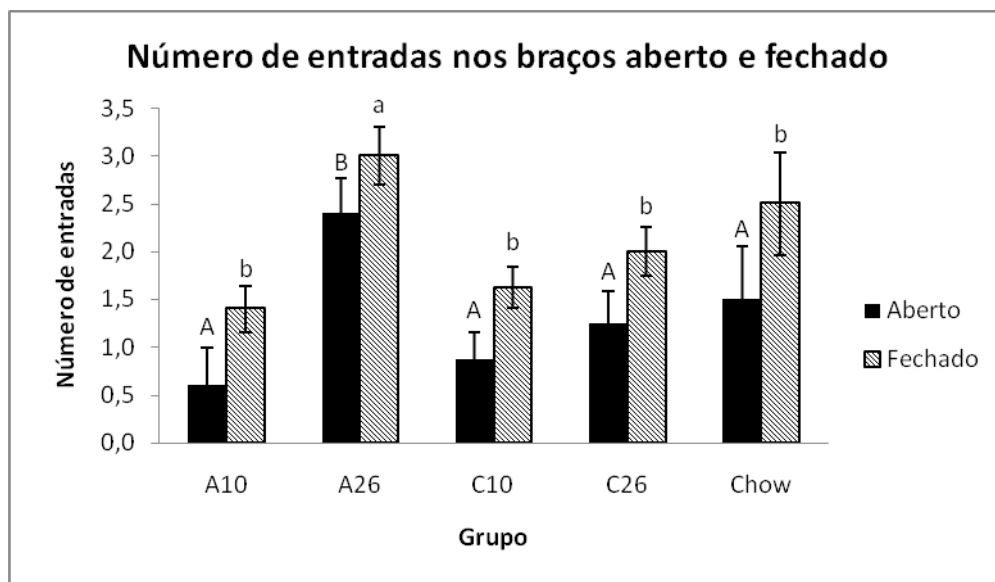


Figura 10. Número entradas (\pm EPM) realizadas nos braços abertos e fechados. Os filhotes foram avaliados após o DPN 35, através da contagem do número de vezes em que o animal entrava com as quatro patas o braço aberto ou fechado do aparato. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – de uma via – n(ninhadas) = 5(A10)-10(A26)-10(C10)-10(C26)-9(Chow). As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Tukey $p < 0,05$).

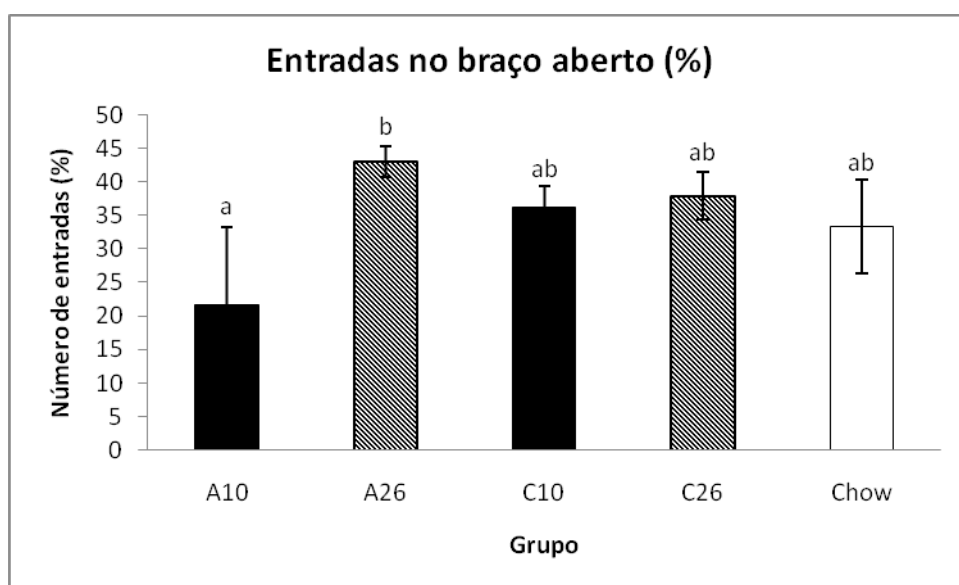


Figura 11. Percentagem de entradas nos braços abertos (\pm EPM). Os filhotes foram avaliados após o DPN 35, através da contagem do número de vezes em que o animal entrava com as quatro patas no braço aberto. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – de uma via – n(ninhadas) = 5(A10)-10(A26)-10(C10)-10(C26)-9(Chow). As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Tukey $p < 0,05$).

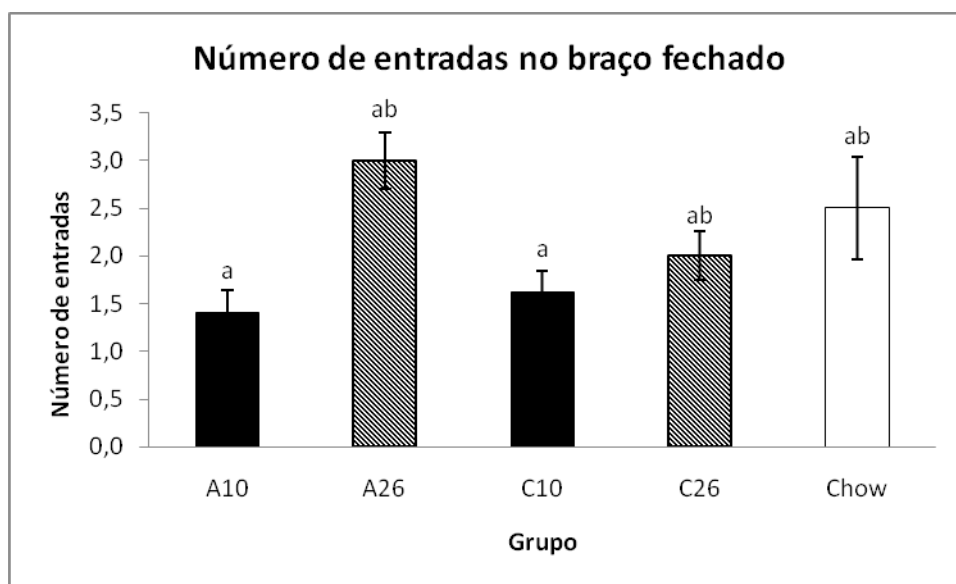


Figura 12. Número de entradas no braço fechado (\pm EPM). Os filhotes foram avaliados após o DPN 35, através da contagem do número de vezes em que o animal entrava com as quatro patas no braço fechado. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – de uma via – n(ninhadas) = 5(A10)-10(A26)-10(C10)-10(C26)-9(Chow). As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Tukey $p < 0,05$).

Tempo gasto nos braços abertos e fechados: Observou-se um efeito principal de grupo tanto para o tempo gasto no braço aberto ($F(4,38) = 10,11$; $p < 0,001$), como para o tempo gasto no braço fechado ($F(4,38) = 10,11$; $p < 0,001$ em que o teste de Tukey demonstrou que o grupo A26 diferiu dos demais grupos, sendo o grupo que manteve-se mais tempo tanto no braço aberto quanto no braço fechado (Figura 13) .

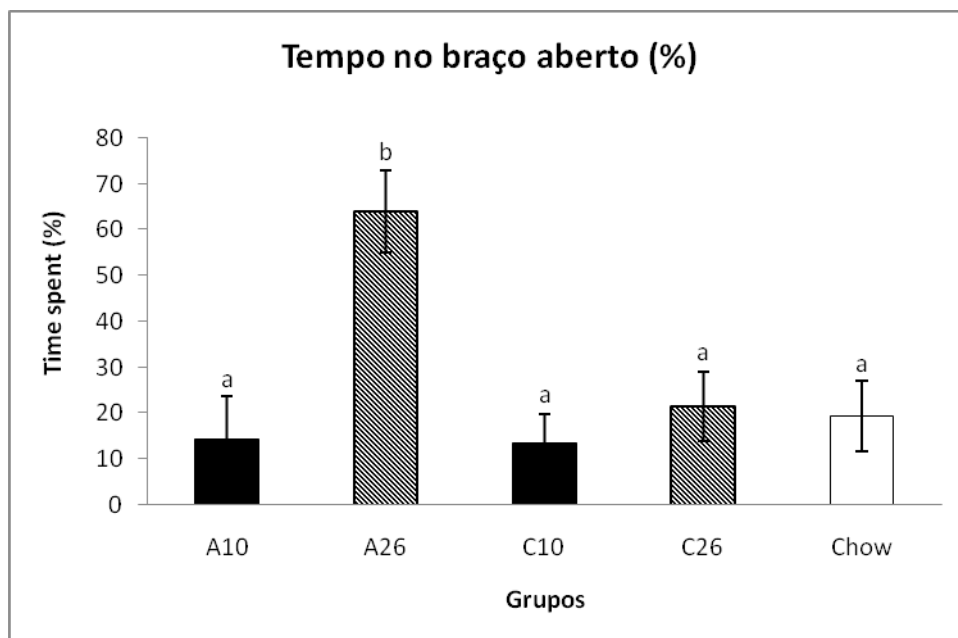


Figura 13. Percentagem de tempo gasto (\pm EPM) pelos filhotes no braço aberto. Os filhotes foram avaliados após DPN 35, pela cronometragem do tempo gasto pelo animal no braço aberto do aparato. A10% = grupo tratado com 10% das calorias derivadas do álcool; A26% = grupo tratado com 26% das calorias derivadas do álcool; C10% = grupo controle; C26% = grupo controle; Chow = grupo controle com ração e água à vontade. ANOVA – de uma via - $n=15(A10)-32(A26)-24(C10)-27(C26)-23(Chow)$. As letras, “a e b” correspondem aos resultados estatisticamente significativos (Tukey $p<0,05$).

1.1.26. Análise dos níveis de álcool no sangue

Tabela 8

Níveis de etanol no sangue no 22º dia de exposição ao álcool.

Grupo	Quantidade ingerida (mL)	Peso (g)	Valor detectado (dcg/L)
A44%	25	230	16,0
	20	185	2,7
A26%	30	260	9,0
	30	246	1,7
A10%	25	282	3,0

Os níveis de etanol no sangue foram analisados conforme descrito no item 4 (Materiais e Métodos). A Tabela 8 acima apresenta os valores encontrados em gramas de álcool por litro de

sangue nas diferentes doses de exposição ao álcool. Foram coletadas duas amostras de cada grupo para o período de exposição de 22 dias, com exceção do grupo A10 em que uma das ratas foi diagnosticada como prenhe e o animal foi preservado, não fazendo parte da análise.

Discussão

O presente trabalho procurou mostrar o efeito que o álcool pode causar na prole quando as ratas mães foram expostas a três diferentes doses de etanol ingeridas durante o período gestacional. Sabe-se que uma dose – um *drink* (uma lata de cerveja) tem aproximadamente 17,5 mL de etanol, tomando um exemplo comum de uma mulher (62 Kg) que consome diariamente 2000 calorias por dia e visto que um grama de etanol contém sete calorias, 10% de etanol são 30 g de etanol/dia (1 g etanol – 0,8 mL de etanol), equivalente a 25 mL de etanol. Uma lata de 350 mL contém 17,5 mL de etanol, o que equivale a uma mais um quarto de lata de cerveja ingerida para atingir a dose de 10% e para a dose de 26% de etanol, fazendo o mesmo cálculo chega-se a 60 mL de etanol o que equivale a três latas e meia de cerveja diária. No Estudo 2 procuramos testar duas diferentes doses que produzissem uma alcoolemia abaixo da dose utilizada para o modelo de síndrome alcoólica fetal (aproximadamente 35% das calorias derivadas do etanol).

Sumarizamos os principais resultados na tabela a seguir:

Tabela 9
Principais resultados do Estudo 2.

Tarefa	Resultado - Estudo 2
Reflexo postural	Grupos A10 e A26 e C10 demonstraram um atraso em relação ao grupo Chow.
Geotaxia Negativa	Grupo Chow demonstrou um resultado linear diferente dos demais grupos.
Força de Agarrar	Atraso dos grupos A10 e A26 em relação ao grupo Chow.
Peso	Não mostrou nenhum resultado expressivo.
Erupção dos incisivos	Grupo Chow mostrou melhor desenvolvimento dentário que os grupos A10 e A26.
Abertura dos olhos	Não mostrou nenhum resultado significativo.
Campo aberto	Grupo C10 fez mais rearings que os demais grupos Embora não seja significativo, o grupo A10 fez o maior número de cruzamentos.
Labirinto em cruz elevado	O grupo A26 fez mais respostas de risco, entrou mais vezes no braço aberto e no braço fechado, e permaneceu mais tempo no braço aberto que os demais grupos.

Questões metodológicas

1.1.27. Estudo 1 - Piloto

De acordo com a Tabela 3, o pequeno número de ninhadas deve-se, além dos possíveis fatores ambientais estressores do biotério onde se encontravam as ratas, à pequena quantidade de fêmeas Lister Hooded (60) disponíveis para os acasalamentos. Existem alguns fatores que devemos levar em consideração para explicar a mortalidade dos filhotes. Como por exemplo, fatores estressores - manipulação neonatal diária (Severino et al., 2004; Sternberg & Ridgway, 2003), a troca das caixas moradia e ajustes de temperatura - fatores intrínseco da linhagem

(Lister Hooded), aceitação dos filhotes pela mãe - comportamento maternal (Kinsley, 1994) e até mesmo o isolamento social que as fêmeas deviam ser submetidas para a manutenção e controle diário da dieta líquida antes e durante o período gestacional. No entanto, o estudo de cada um desses fatores seria a composição de novos projetos de pesquisa. A idade da fêmea parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento do feto, uma vez que ratas mais jovens (50 dias) tiveram maior dificuldade de levar a gestação à termo que as demais ratas (Ferrari et al., 1992).

O número de ninhadas canibalizadas foi maior no grupo A44, atingindo 50% do grupo. Já no grupo C44, das oito fêmeas que pariram apenas duas canibalizaram seus filhotes (25%) e no grupo Chow houve 20% de canibalismo ou rejeição dos filhotes, embora poucas ratas tenham parido (5). O canibalismo no grupo Chow sugere que esta linhagem de ratos tem uma tendência ao canibalismo dos filhotes. Os cuidados parentais podem ser diferentes dependendo das condições físicas dos filhotes. O filhote é bastante dependente da mãe para sobreviver nos primeiros dias de vida. Eles nascem bastante imaturos, apresentam capacidades sensoriais limitadas, são incapazes de ver, ouvir e se locomover de forma coordenada, não conseguem regular a temperatura corporal de forma independente e nem se alimentarem sozinhos (Abel, 1979; Vieira, 2003). Por todos esses motivos é comum ocorrer canibalismo entre os roedores, inclusive quando o número de filhotes paridos pela fêmea é maior do que ela poderia sustentar e cuidar, de modo que ela acaba selecionando os filhotes que devem viver. O grupo A44 mostrou um índice de canibalismo ou rejeição dos filhotes maior que os dos grupos controles, o que nos leva a sugerir que o etanol contido na dieta líquida das ratas prenhes durante a gestação poderia ter influenciado na maturação e desenvolvimento da prole (Abel, 1979). Uma das maneiras que isso poderia ter acontecido teria sido via leite materno (Pueta, Abate, Haymal, Spear, & Molina,

2008), visto que o etanol pode interferir na liberação da ocitocina durante a gestação, reduzindo a quantidade de leite materno produzida pela rata no período neonatal (Heil & Subramanian, 2000; Sanchis et al., 1988; Subramanian, 1995). O comportamento materno é desencadeado por diversos mecanismos, dentre eles a elevação de ocitocina que ocorre durante o parto; elevação de prolactina, lactógeno placentário e estradiol e queda de progesterona. Fatores que alteram tais hormônios podem afetar o comportamento materno e suas variáveis fisiológicas (Bridges et al., 1997; Numan et al., 1999). Assim como os bebês (Faas, Spontón, Moya, & Molina, 2000; Mennella, 2001), os filhotes de roedores parecem ser capazes de processar apenas pequenas quantidades de etanol do líquido amniótico durante a fase gestacional, de maneira que grandes quantidades são tóxicas para o feto (Molina, Spear, Spear, Mennella, & Lewis, 2007; Pepino, López, Spear, & Molina, 1998).

É possível que no estudo piloto tenha ocorrido um efeito confundidor nutricional, visto que a dieta líquida do grupo tratado não continha a quantidade calórica adequada de carboidratos (maltodextrina) para as ratas mães na fase gestacional, conseqüentemente, o grupo controle, sendo par-emparelhado também foi prejudicado nutricionalmente. Um estudo demonstrou que ratas que se alimentaram com uma dieta de alto teor protéico, porém baixo teor de carboidratos durante o período gestacional foram mais propensas a terem filhotes com baixo peso, e alteração do eixo HPA (hipotálamo – hipófise – adrenal), aumentando os níveis de cortisol dos filhotes (Herrick et al., 2003). O consumo excessivo de álcool pode levar o indivíduo a uma desnutrição secundária, resultante de uma má digestão e/ ou absorção dos nutrientes presentes na dieta, ocasionadas por complicações gastrintestinais associadas ao álcool (Lieber, 1988).

A literatura demonstra que os efeitos do etanol no feto podem ser aliviados quando aumentada a percentagem protéica da dieta (32%) (Lancaster et al., 1987). Em nosso trabalho,

segundo as informações nutricionais do fornecedor (BioServ®) da dieta líquida com etanol continha 27% em proteínas. É provável que a baixa ingestão de dieta líquida pelas fêmeas prenhes (Tabela 4) possa ter ocorrido devido a alta dose de etanol utilizada (44%), lembrando que o consumo pelas ratas não foi palatável e sim desagradável, fazendo com que elas consumissem um mínimo necessário diariamente. Assim, a quantidade calórica diária ingerida foi reduzida a uma média de 30 Kcal por dia - A44% e C44% - quando comparada a ingestão diária das ratas com dieta sólida - grupo Chow (500cal/Kg peso) – equivalente a 100 Kcal diárias para uma rata de 250 g (Sanchis et al., 1988). Após a descoberta de Lieber e DeCarli em 1963 da dieta líquida com etanol muitas outras versões de dieta líquida com etanol já foram propostas, mas o prejuízo nutricional não pode ser ignorado em relação aos filhotes (Sanchis et al., 1988).

Visto que possa ter ocorrido um prejuízo nutricional e de acordo com a tabela nutricional fornecida pelo fabricante das dietas líquidas (BioServ® - item 4.1.2), foi concluído que seria necessário para o próximo estudo (Estudo 2), a adição de calorias à dieta líquida das ratas. Dessa maneira, suplementaríamos isocaloricamente a dieta líquida do grupo álcool com uma quantidade maior de carboidratos. Sugerindo que no próximo estudo seja adicionado maltodextrina (carboidrato complexo, composto de uma mistura de dextrina e maltose obtida por hidrólise parcial do amido de milho) à formulação a fim de balancear as calorias ingerida pelas ratas prenhes (Chakkalakal et al., 2002; Grenby & Mistry, 2000).

1.1.28. Estudo 2

De acordo com as dificuldades enfrentadas no estudo Piloto, foram propostas algumas alterações no Estudo 2 a fim de atingir os objetivos propostos. Foi necessário aumentar o número de ratas disponíveis para os acasalamentos a fim de obter um maior número amostral de

ninhadas. A dieta líquida com álcool foi suplementada com maltodextrina a fim de tornar a dieta isocalórica entre os grupos controles e os grupos tratados com álcool. Esse ajuste deve-se ao fato de que o pó da dieta vendido pelo fornecedor (BioServ®) prepara uma dieta padrão para uma concentração de 35% de calorias derivadas do álcool. E quando essa concentração é variada a quantidade calórica deve ser balanceada com a adição de maltodextrina, conforme a tabela apresentada pelo site da BioServ®. Foram testadas duas doses diferentes de álcool inferiores à dose utilizada no estudo piloto, no entanto, não foi possível coincidir o período gestacional das ratas tratadas com álcool e as controles, não sendo possível manter o sistema par-emparelhado. Por isso, todas as ratas foram alimentadas diariamente com 90 mL de dieta líquida, diferente do estudo piloto, em que as ratas do grupo álcool alimentavam-se à vontade e as ratas do grupo controle recebiam a mesma quantidade ingerida pelas ratas grupo álcool no dia anterior. Além disso, foi acrescentado um teste de comportamento para verificar o nível de ansiedade dos filhotes através da tarefa do Labirinto em Cruz Elevado.

No estudo 2 foram utilizadas 96 ratas fêmeas da linhagem Lister Hooded em idade reprodutiva e disponível para o acasalamento. Aproximadamente 65% dessas ratas foram diagnosticadas como prenhes e 50% constituíram ninhadas. Essa diferença percentual deve-se aos falso-positivos do diagnóstico no esfregaço vaginal e também pelas gestações que não foram levadas à termo.

A fim de investigar o motivo de tantos falso-positivos, uma amostra de 5 fêmeas (uma de cada grupo, foram sacrificadas para posterior análise e certificação dos implantes uterinos (endometriais). Das cinco fêmeas analisadas três continham implantes uterinos (Chow, A26 e C26) e duas não continham (C10 e A10). O implante uterino é o sítio de implantação do embrião na parede uterina. No caso das ratas que não levaram a gestação à termo, a presença de implantes

é um indicativo de que a perda gestacional ocorreu no período de pós-implantação, ou seja, a partir do 5º dia de gestação (Santos et al., 2009). O álcool pode interferir na morfogênese de vários órgãos e levar a alterações físicas, cognitivas e comportamentais permanentes e irreversíveis (J. D. Cook, 2003). Os prejuízos causados pelo álcool podem variar, de acordo com diversos fatores como: níveis de alcoolemia, quantidade de álcool ingerida, suscetibilidade da espécie, entre outros (Molina et al., 2007). No entanto, não podemos afirmar que o álcool foi o fator responsável pelo número de falso-positivos nos acasalamentos, visto que foram encontrados implantes uterinos em ambos os grupos, tanto nos controles quanto no grupo álcool. Entretanto, alguns estudos mostraram que o consumo de álcool próximo a data da concepção ou na primeira fase gestacional aumenta a frequência de reabsorção embrionária, anormalidades cromossômicas e até mesmo morte fetal (Abel & Berman, 1994; Henriksen et al., 2004; Mitchell, 1994; Riesenfeld & Oliva, 1987). Seria necessário um estudo mais aprofundado e detalhado, com um número amostral maior de ratas e um controle mais rigoroso da quantidade de álcool ingerida (gavagem) para obter respostas conclusivas.

Um fator limitante do estudo que deve ser lembrado é que na última semana dos acasalamentos as ratas do grupo A26 foram alocadas para acasalar com os machos durante cinco dias consecutivos. De acordo com as datas dos partos obtidos elas poderiam ter ficado sem receber a dieta líquida até o terceiro dia da gestação, no entanto nos vinte e um dias seguintes do período gestacional seguiu-se a administração da dieta líquida normalmente.

Com o maior número de ratas fêmeas disponíveis esperava-se um número amostral maior de animais por grupos no Estudo 2. No entanto, alguns problemas com agentes estressores no ratário onde se encontravam as ratas devem ser levados em consideração, o que poderia ter influenciado tanto a fase gestacional quanto a fase pós-natal. Sabe-se da literatura que agentes

estressores durante a fase gestacional podem ocasionar elevação da ansiedade da mãe (Götz & Stefanski, 2007), diminuição das defesas do sistema imunológico (Götz, Wittlinger, & Stefanski, 2007), interferir na fertilidade da fêmea (Götz, Wolf, & Stefanski, 2008), além de interferir no desenvolvimento dos filhotes, como na modificação das vocalizações ultrasônicas (Williams, Hennessy, & Davis, 1998), no estado emocional (Tazumi et al., 2005) e também nas funções motoras (Buitelaar, Huizink, Mulder, Medina, & Visser, 2003). Entretanto, sabe-se que todos os animais, tanto dos grupos álcool como dos grupos controles estavam sujeitos as mesmas condições ambientais do ratário, e, por isso, sujeitos as mesmas condições experimentais.

Semelhante ao estudo piloto foi observada uma alta taxa de mortalidade por canibalismo mesmo sob doses de etanol mais baixas (10 e 26%). Sendo uma taxa de aproximadamente 50% nas ninhadas canibalizadas ou rejeitadas nos grupos álcool e 20% nos grupos controles. A diferença foi que nesse estudo, grande parte das ninhadas foram canibalizadas após o DPN7, principalmente nos grupos álcool, onde encontramos filhotes que foram canibalizados no DPN 15, 16 e 17, enquanto que no estudo piloto os filhotes foram canibalizados ou rejeitados logo após o nascimento. O canibalismo entre os ratos pode ocorrer por diferentes e múltiplas razões como teratogenia, baixo peso, estresse ambiental ou até pela frequência da troca das caixas moradias (Burn & Mason, 2008). O nosso estudo sugere que, mesmo levando os demais fatores ambientais em consideração, o canibalismo presente, inclusive no grupo Chow, demonstra uma possível tendência a um tipo de canibalismo intrínscico desta linhagem (Lister Hooded), sugerindo que em futuros trabalhos sejam testadas outras linhagens de ratos.

Segundo a Tabela 7 a ingestão da dieta líquida diária de 90 mL para cada rata foi bastante superior aos 24 mL (dieta líquida à vontade) ingeridos no estudo piloto. Com o propósito de testar uma dose de etanol mais baixa, utilizaram-se as doses de 10% e 26% de calorias derivadas

do etanol. As doses foram bem aceitas pelas ratas sendo bastante palatáveis. A média de ingestão diária foi de 5,44g/kg e 14,08g/kg, respectivamente para os grupos 10% e 26%. Sendo que as ratas dos grupos controle tomavam a mesma quantidade de dieta que as ratas dos grupos álcool, com exceção do grupo Chow que se alimentava de ração sólida e tomava água à vontade.

Testes de reflexos

A observação diária dos reflexos (reflexo postural, geotaxia negativa e força de agarrar) são indicadores sensíveis dos primeiros estágios do desenvolvimento do neonato (Martin, Martin, Radow, & Sigman, 1976; Whishaw & Kolb, 2005). O reflexo medular postural é um dentre vários reflexos relativamente complexos que estão associados à postura, os quais são parcialmente integrados na medula e que os animais devem apresentar logo no nascimento. A substância cinzenta da medula é uma zona de integração para os reflexos medulares e outras funções motoras. O reflexo postural é considerado pleno quando o animal retorna imediatamente à sua posição normal sobre as quatro patas em decúbito ventral (Maior, Siqueira, Barbosa, & Almeida, 2003; Pellis & Pellisa, 1994). No nosso estudo foi observado um atraso no controle motor fino nos primeiros dias de vida sendo que os ratos expostos à dieta líquida contendo álcool mostraram-se atrasados em relação ao grupo Chow.

Segundo Motz e colaboradores, o reflexo da geotaxia negativa refere-se a uma resposta de orientação e a movimentos expressos em oposição às pistas dos vetores gravitacionais. A tarefa é considerada diagnóstica para função vestibular e/ou proprioceptiva. O desenvolvimento da geotaxia negativa é normalmente analisado em ratos jovens e parece ser uma forma de

resposta compensatória ou até uma resposta de emergência à instabilidade postural em uma superfície inclinada (Motz & Alberts, 2005). O teste de força de agarrar geralmente é utilizado em baterias de testes de desenvolvimento a fim de complementar os testes de função motora, através da cronometragem do tempo que o animal fica suspenso à barra do aparato demonstra também uma resposta de força muscular e articulação das patas desenvolvida (Maurissen et al., 2003). Já foi visto na literatura que diferentes tipos de dietas alimentares podem provocar mudanças no peso corporal e também na massa muscular presente nas pernas do animal, podendo ser medido através do teste de força de agarrar (Maurissen et al., 2003).

Em nosso estudo piloto foi observado um atraso das médias dos reflexos dos grupos tratados com álcool quando comparado com o grupo Chow. Em todos os reflexos observados (postural, geotaxia negativa e força de agarrar) há uma linearidade do reflexo com o dia em que o teste foi realizado, com a tendência a demonstrar um melhor desempenho com o passar dos dias, ou seja, apresentar o reflexo mais desenvolvido ou bem formado. No entanto, percebe-se que essa linearidade no grupo Chow tende a ser menor, os filhotes demonstraram desenvolver antes os reflexos do que os grupos tratados com álcool. O reflexo de geotaxia negativa, por exemplo, espera-se estar formado entre o DPN 7-10. Os filhotes do grupo A44 mostraram média de tempo de reflexo formado (acima de 30s) inferior aos dos grupos controles (média de tempo abaixo de 30s). Isso sugere que nesse período da vida os filhotes do grupo A44 mostraram um atraso no desenvolvimento em relação aos grupos controles, pois apresentavam instabilidade postural e função vestibular e proprioceptiva ainda em formação, enquanto os filhotes dos grupos controles (Chow e C44) já apresentavam esse reflexo formado no período esperado. Esse mesmo atraso no desenvolvimento também ocorreu para os testes de reflexo postural e para o teste de força de

agarrar, sugerindo que o álcool pode ter causado um efeito sobre o reflexo inato dos filhotes cujas mães ingeriram álcool durante a gestação.

Os resultados encontrados em nosso trabalho estão de acordo com a literatura. Um estudo mostrou que crianças, filhas de mães alcoólatras (SAF) demonstraram um desempenho extremamente pobre (Burd, Cotsonas-Hassler, Martsolf, & Kerbeshian, 2003) quando foi necessária a utilização do sistema somatosensorial bem como em tarefas que exigiam controle motor e também força muscular. Algumas crianças ainda apresentaram prejuízos visuais, auditivos e olfativos (Barron & Riley, 1992; M.W. Church & Abel, 1998; M.W. Church, Abel, Kaltenbach, & Overbeck, 1996).

No Estudo 2, em que as ratas foram expostas a doses de 10 e 26% de calorias derivadas do álcool também foram encontrados diferenças entre os grupos tratados e os grupos controles. Nos testes de reflexos, também foi observada diferença significativa no fator sexo, mostrando que as fêmeas tendem a levar mais tempo para formar o reflexo postural que os machos. Além disso, os grupos tratados com álcool levaram mais tempo para completar a tarefa que o grupo Chow.

No teste de geotaxia negativa há um forte efeito linear nos grupos A10 e A26, no entanto os grupos controles apresentaram um suave efeito linear com o passar dos dias e no grupo Chow o efeito não é percebido. Os filhotes dos grupos A10 e A26 mostraram um atraso em relação ao grupo Chow, ou seja, o grupo Chow mostrou o reflexo de reorientação (geotaxia) formado logo no primeiro dia de teste (DPN7) enquanto os filhotes dos grupos álcool foram demonstrar o mesmo desempenho apenas no DPN 9 e 10. O teste de força de agarrar complementa os resultados mostrando que o grupo Chow e C26 demonstraram uma melhora significativa da força

de suspensão à barra no segundo dia de teste, permanecendo mais tempo suspenso à barra que os demais filhotes no DPN17 (Maurissen et al., 2003). Os testes de reflexo realizados nos levam a sugerir que o álcool administrado durante a gestação possa ter interferido nos reflexos dos filhotes nos primeiros dias de vida, visto que os animais cujas mães foram tratadas com álcool no período gestacional mostraram-se prejudicados em relação aos grupos controles nas tarefas de reflexo postural, geotaxia negativa e força de agarrar. No entanto, foi importante para delineamento experimental a manutenção de um grupo Chow (dieta sólida), visto terem ocorrido diferenças mesmo entre os grupos controles de dieta líquida, já que devemos considerar também as variações biológicas intrínsecas de cada animal e os fatores ambientais a que estavam sujeitos.

Testes maturacionais

A observação das características maturacionais (peso, erupção dos incisivos e abertura dos olhos) foi realizada em todos os filhotes de acordo com o dia pós-natal. Essas observações permitem-nos perceber se há atraso maturacional dos filhotes tratados com álcool em relação aos filhotes dos grupos controles. Esse tipo de teste tem por objetivo descobrir se há diferença entre os grupos em relação ao peso, o primeiro dia do aparecimento dos incisivos e também quanto ao primeiro dia de abertura dos olhos.

Características da teratogenicidade do etanol incluem baixo peso ao nascer bem como maior dificuldade de ganho de peso após o nascimento (Abel, 1996; Mariscal, Llorca, Rez-Iguezias, Pardo-Crespo, & Guez, 2006). Nos nossos estudos não foi significativa a diferença de peso ao nascer entre os grupos. No entanto, o grupo Chow apresentou sempre o maior peso até o

dia do desmame, sugerindo que os demais filhotes apresentaram maior dificuldade em ganhar peso ao longo dos dias. No entanto, no Estudo 2, os grupos controle de dieta líquida (C10 e C26) comportaram-se muito semelhante aos grupos tratados com álcool. Dados epidemiológicos demonstram que o baixo peso ao nascer está intimamente relacionado com a dose administrada durante a fase gestacional (Gallo & Weinberg, 1982; Lazzaroni et al., 1993; Lumley, Correy, Newman, & Curran, ; Primatesta, Del Corno, Bonazzi, & Waters, 1993). É muito comum na SAF os animais apresentarem baixo peso ao nascer, sendo uma das características marcantes dessa síndrome, justamente quando a dose administrada é sempre maior que 35% de calorias derivadas do álcool (Abel, 1996; Mariscal et al., 2006). Mas sob doses moderadas, alguns estudos demonstraram que o peso ao nascer dos filhotes de grupos tratados com álcool durante a gestação, tanto com dieta líquida ou através de gavagem, é semelhante ou até maior que o peso dos grupos controles (Abel, 1996; Caul, Osborne, Fernandez, & Henderson, 1980; Hood, Lary, & Blacklock, 1979; Zimmerberg, Sukel, & Stekler, 1991). Também em nosso trabalho, sob doses de álcool moderada (10 e 26%), os filhotes apresentaram pesos, no dia do nascimento, semelhantes aos dos grupos controles, porém com uma leve dificuldade de ganhar peso até o desmame. Tendo visto com o estudo piloto que sob uma dose alta (44%) os filhotes apresentaram dificuldade no ganho de peso e que sob doses moderadas eles apresentam peso regular, parece que o álcool exerce uma influência dose-específica sobre o fator peso, bem como já retratado na literatura e citado anteriormente.

Em nosso trabalho foi observado o dia de incidência da erupção dos incisivos de todos os filhotes no período do DPN7 ao DPN10 a fim de comparar se haveria diferença no tempo de erupção entre os diferentes grupos de tratamento e controles. Nós observamos um atraso no dia de erupção dos incisivos dos filhotes do grupo A10 e A26 em relação aos grupos controles. Os

resultados encontrados confirmam os dados já descritos na literatura da interferência do álcool sob dieta líquida (consumo médio de 12.36 g/kg/dia) na erupção dos dentes incisivos e no desenvolvimento (Gottesfeld & Silverman, 1990; Lopez-Tejero, Ferrer, & Herrera, 1986; Potter & Berntson, 1987; Thomas, Abou, & Dominguez, 2009; Vorhees & Fernandez, 1986). O nosso trabalho concorda com a literatura e sugere que o álcool administrado no período gestacional através de dieta líquida, sob as diferentes doses, interfere no desenvolvimento dentário, atrasando o dia de erupção do dente incisivo do animal (Sant'anna, 2001).

Os testes de maturação e desenvolvimento visam confirmar a teratogenicidade e a influência de determinada droga ou substância nos indivíduos (Pometlova, Hrubá, Lamberova, & Rokyta, 2009). Os testes utilizados em nosso trabalho sugerem que a exposição ao álcool no período gestacional influenciou, principalmente, na maturação dos dentes dos filhotes, demonstrando que esses filhotes retardaram o aparecimento dos incisivos. No entanto, quando os filhotes tratados com álcool são comparados com o grupo Chow eles apresentam atraso em todos os testes, independente da dose de álcool administrada (44%, 10% ou 26%).

O teste de abertura dos olhos não demonstrou resultados significativos, embora no Estudo 2 todos os grupos tenham diferido do grupo Chow. No entanto, essa diferença apresentou-se apenas no primeiro dia, desaparecendo essa diferença nos demais dias do teste.

Testes comportamentais

As tarefas do campo aberto e do labirinto em cruz elevado (LCE) são consagradas em pesquisa básica e permitem a avaliação do comportamento animal em diversos aspectos. Na

tarefa do campo aberto o número de cruzamentos é a medida mais utilizada na avaliação da atividade locomotora, sendo o mais importante parâmetro a ser analisado nessa tarefa (Brenes, Padilla, & Fornaguera, 2009). O nosso trabalho demonstrou que o grupo dos filhotes cujas mães foram tratadas com a dose mais baixa de álcool (A10% - 5,44g/Kg/dia) foi o que apresentou o maior número de cruzamentos entre quadrantes na tarefa do campo aberto. A literatura ainda parece controversa quanto a esse aspecto. Em 1978 um estudo de Abel e colaboradores mostrou que a administração de álcool por gavagem durante a gestação sob doses moderadas de 4 ou 6g/Kg/dia foram capaz de provocar alteração da atividade locomotora causando hiperatividade na prole (Abel & Dintcheff, 1978). Já um estudo de 1996, realizado com camundongos expostos a doses moderadas de álcool em solução aquosa (1,58g/Kg/dia etanol) durante a fase pré-natal mostrou que os filhotes foram testados quanto à atividade locomotora tanto nas caixas moradias quanto na tarefa do campo aberto, no entanto apenas demonstraram alteração da atividade locomotora nas caixas moradia (Mothes et al., 1996).

O número de respostas de orientação foi outro parâmetro analisado na tarefa do campo aberto, em todos os grupos, exceto o grupo C10%, houve uma diminuição do número de *rearings* no dia do teste, demonstrando a habituação dos animais ao aparato.

No LCE a exploração no braço aberto parece estar inversamente relacionada à ansiedade (File, 1996; Morgan & Pfaff, 2001; Padovan, Del Bel, & Guimarães, 2000). Acredita-se que a aversão dos ratos a espaços abertos, provavelmente, se deva à impossibilidade de orientação por suas vibrissas, importante órgão sensorial destes animais (Treit, 1985). Segundo Graeff e colaboradores (1994) existem dois grupos de fatores que devem ser analisados nessa tarefa, um deles indicará sobre a ansiedade e o outro sobre a atividade locomotora no aparato. O primeiro fator relaciona-se a medidas sobre o braço aberto sendo indicativas da ansiedade dos animais.

Sendo elas: o número de entradas, o tempo gasto, a percentagem do número entradas, a percentagem do tempo gasto e o número de respostas de risco realizadas. Já no segundo fator estão incluídas respostas indicativas da atividade locomotora dos animais. Sendo elas: o número de entradas nos braços fechados, número de entradas totais (nos dois braços) e o número de respostas de orientação (*rearings*). O nosso trabalho mostrou que o grupo A26 foi o que permaneceu mais tempo (%) no braço aberto, fez o maior número (%) de entradas no braço aberto e o maior número de respostas de risco. Tendo em vista que a permanência em espaços abertos demonstra baixa ansiedade, pode-se dizer que esse grupo de animais apresentou um comportamento indicativo de baixa ansiedade quando comparado com os demais grupos. No entanto quanto ao fator dois esse mesmo grupo (A26) também apresentou o maior número de entradas no braço fechado e o maior número de entradas totais, nos dois braços, demonstrando uma atividade locomotora elevada. Esse resultado concorda com a literatura, que associa a hiperatividade de crianças com mães usuárias de álcool no período gestacional (Coffin, Baroody, Schneider, & O'Neill, 2005; Stratton & Gailfus, 1998).

A literatura fornece evidências empíricas que sugerem que as populações de indivíduos com SAF ou até mesmo com os efeitos do espectro do álcool fetal (FASD) parecem apresentar reações demasiadamente impulsivas e não premeditadas demonstrando problemas de socialização e comunicação (Momino, Sanseverino, & Schüler-Faccini, 2008; Streissguth, Barr, Kogan, & Bookstein, 1996). Atualmente tem sido proposto que a tarefa do LCE seja enriquecida com a medida da avaliação de risco que tem por finalidade avaliar o comportamento de risco do animal (Carobrez & Bertoglio, 2005; Mikics, Barsy, Barsvari, & Haller, 2005). A fim de confirmar esse comportamento, a análise das respostas de risco forneceu-nos outro parâmetro de estudo. O comportamento de risco foi analisado pelo número de vezes que os animais alongavam

a cabeça para fora do braço aberto, sem retirar as patas do lugar onde se encontravam (Dawson & Tricklebank, 1995). O grupo A26 foi o grupo que apresentou maior número de respostas de risco com média superior aos demais grupos. A análise de comportamento de risco observada nos leva a sugerir que o alto número de respostas de risco no braço aberto, vem a concordar com o desempenho dos animais do grupo A26, apresentando um comportamento arriscado (dificuldade de discernir uma situação de risco) e menos ansioso que os demais animais. Outros testes de medida de hesitação e de risco envolvido ajudariam a evidenciar esse efeito.

Análise dos níveis de álcool no sangue

Os níveis de álcool no sangue de roedores podem ser afetados por diversos fatores, incluindo a linhagem, idade, sexo, via de administração, dose, o estado alimentado do animal, e o período de exposição ao etanol (Collins, Yeager, Lebscock, & Panter, 1975; Desroches, Orevillo, & Verina, 1995; Kelly, Bonthius, & West, 1987; Maier, Strittmatter, Chen, & West, 1995). Segundo Abel o método da administração da dieta líquida não é o melhor método para análise de álcool no sangue, pois esse tipo de métodos não garante um controle adequado, sendo mais aconselhado a gavagem, pois permite que os níveis de álcool no sangue sejam mais bem monitorados e controlados para posterior análise (Abel, 1984; Bielawski & Abel, 2002).

Não há um consenso na literatura de qual seria o melhor horário do ciclo claro/escuro a ser feita a coleta de sangue para análise. Em nosso trabalho, a coleta do sangue foi realizada após três horas do início do ciclo escuro, visto que roedores são animais noturnos e costumam alimentarem-se durante esse período (Ferguson, Holson, Allen, & Paule, 1995). Os animais

foram decapitados e o sangue coletado foi corretamente armazenado para análise. O maior nível de álcool no sangue encontrado foi no grupo A44 (16 dcg/L), como era esperado, no entanto, o resultado não se repetiu com a segunda amostra (2,7 dcg/L). No grupo A26 também foram encontrados níveis elevados (9,0 dcg/L), no entanto, esses níveis correlacionam-se a níveis de etanol no sangue comumente encontrados em humanos sob controle social (Eckardt et al., 1998). Já no grupo A10 tivemos apenas uma amostra não sendo viável haver comparações. O resultado encontrado (3,0 dcg/L) foi bastante considerável para essa dose. Para um resultado mais preciso e exato, seria necessária a confirmação pelo método de gavagem, pois parece que a análise está intimamente correlacionada com o momento em que o animal alimenta-se e o momento em que é realizada a decapitação para a coleta do sangue. Ainda assim, nosso estudo foi capaz de comprovar que o álcool estava presente no sangue desses animais e os demais resultados de maturação, desenvolvimento e comportamento dos filhotes, poderiam estar sujeitos a influência dessa droga.

Conclusão

O álcool, quando administrado no período pré-natal, é uma droga de efeitos complexos. A diversidade de fatores associados ao uso do álcool nesse período sugere a necessidade de medidas preventivas, como a não ingestão de bebidas alcoólicas, com o intuito de minimizar os efeitos que essa droga pode causar no feto. O estado nutricional da mãe parece ser um dos fatores mais importantes associado ao álcool na gestação. O controle nutricional é imprescindível para evitar problemas metodológicos futuros. O nosso trabalho mostrou que o álcool foi capaz de provocar prejuízos diretos no desenvolvimento de animais cujas mães foram expostas ao álcool no período pré-natal. Esses prejuízos podem variar de acordo com os fatores envolvidos, como os níveis de alcoolemia, quantidade de álcool ingerida, suscetibilidade da espécie entre outros. No entanto, mesmo sob doses moderadas foi possível verificar que o etanol administrado no período pré-natal pode ocasionar prejuízos motores, maturacionais e comportamentais, podendo ser prejudicial a ingestão alcoólica durante o período gestacional. Contudo, são necessários estudos complementares para evidenciar os efeitos encontrados.

Perspectivas

Para experimentos futuros pretende-se testar uma linhagem diferente de animais, como a Wistar, a fim de tentar obter um menor número de canibalismos durante o experimento. Além disso, uma mudança no sistema de acasalamentos faz-se necessário. Colocar a fêmea com o macho durante cinco dias consecutivos (um ciclo estral completo) acredita-se que seria mais efetivo, do que o método utilizado nesse trabalho (colocar a fêmea com o macho apenas durante o ciclo escuro e retirá-la no ciclo claro para que ela se alimente da dieta líquida com álcool e não de ração e água).

A utilização de outras concentrações de álcool também seria interessante de serem testadas em novos estudos, sugerindo serem utilizadas concentrações como A35% e C35, A10% e Chow, fazendo com que o C35 e o A10% sejam os grupos par-emparelhados com o A35%, para garantir que todos ingiram a mesma quantidade de dieta líquida.

Na tentativa de eliminar os efeitos que pudessem interferir no desenvolvimento pós-natal, a manipulação neonatal poderia ser diminuída, à medida que os testes maturacionais sejam adaptados para serem realizados após duas semanas de vida dos filhotes, além de monitorar o comportamento maternal nas ninhadas, e observar diferenças entre mães que ingeriram álcool e mães controles.

Referências

- Abel, E. L. (1979). Effects of alcohol withdrawal and undernutrition on cannibalism of rat pups. *Behavioral and Neural Biology*, 25(3), 411-413.
- Abel, E. L. (1984). *Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Effects*. New York, NY.
- Abel, E. L. (1988). Fetal alcohol syndrome in families. *Neurotoxicology and Teratology*, 10(1), 1-2.
- Abel, E. L. (1996). Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Birth Weight in Rats: Is There an Inverted U-Shaped Function? . *Alcohol*, 13(1), 99-102.
- Abel, E. L., & Berman, R. F. (1994). Long-term behavioral effects of prenatal alcohol exposure in rats. *Neurotoxicology and teratology*(n.16), 467-470.
- Abel, E. L., & Dintcheff, B. A. (1978). Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Growth and Development in Rats. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 207(3), 916-921.
- Abel, E. L., & Hannigan, J. H. (1995). Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: Provocative and permissive influence? *Neurotoxicology and Teratology* 17, :445-462.
- Alberts, J. R. (1984). Sensory perceptual development in the Norway rat: A view toward comparative studies. In comparative perspectives on memory development. *New York: Plenum*, 65-101.
- Alderazi, Y., & Brett, F. (2007). Alcohol and the nervous system. *Current Diagnostic Pathology*(n.13), 203 - 209.
- Barash, J. H., & Weinstein, L. C. (2002). *Primary Care Clinical Office Practical*, 29, 519-542.
- Barbier, E., Warnalt, H. H. V., Daoust, O. P. M., & Naassila, M. (2009). Effects of Prenatal and Postnatal Maternal Ethanol on Offspring Response to Alcohol and Psychostimulants in Long Evans Rats. *Neuroscience* 161, 427-440.
- Barron, S., & Riley, E. P. (1992). The effects of prenatal alcohol exposure on behavioral and neuroanatomical components of olfaction. *Neurotoxicology and Teratology*, 14, 291- 297.
- Bielawski, D. M., & Abel, E. L. (2002). The effect of administering ethanol as single vs. divided doses on blood alcohol levels in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 559-562.
- Brenes, J. C., Padilla, M., & Fornaguera, J. (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research* 197, 125-137.
- Bridges, R. S., Robertson, M. C., Shiu, R. P., Sturgis, J. D., Henriquez, B. M., & Mann, P. E. (1997). Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats:

- Steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen. *Endocrinology*, *138*(2), 756-763.
- Buitelaar, J. K., Huizink, A. C., Mulder, E. J., Medina, P. G. R., & Visser, G. H. A. (2003). Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. *Neurobiology of Aging* *24*, S53-S60.
- Burd, L., Cotsonas-Hassler, T. M., Martsolf, J. T., & Kerbeshian, J. (2003). Recognition and management of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology and Teratogenicity*, *25*, 681- 688.
- Burn, C. C., & Mason, G. J. (2008). Effects of cage-cleaning frequency on laboratory rat reproduction, cannibalism, and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, *114*, 235-247.
- Cabral, A., & Almeida, S. S. (2008). Effects of tactile stimulation and underwater trauma on the behavior of protein-malnourished rats in the elevated plus-maze test. *Psychology & Neuroscience*, *1*(1), 67 - 72.
- Carneiro, L. M. V. (2005). Behavioral and Neurochemical effects on rats offspring after prenatal exposure to ethanol. *Neurotoxicology and Teratogenicity*, *27*, 585-592.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience Biobehaviour Review*, *29*(1), 193-205.
- Castro, S. S. (2006). Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos [Electronic Version]. *Circular Técnica - Embrapa*.
- Castro, S. S., Destefani, C. R., Diniz, C., & Poli, P. (2007). Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. *Neurotoxicology and Teratology*(28), 1249 - 1259.
- Caul, W. F., Osborne, G. L., Fernandez, K., & Henderson, G. I. (1980). Acute ethanol exposure and protein synthesis in the fetal rat: Dose-response. *Alcohol Clinical Experimental Research*, *4*, 214.
- Chakkalakal, D. A., Novak, J. R., Fritz, E. D., Mollner, T. J., McVicker, D. L., Lybarger, D. L., et al. (2002). Chronic Ethanol Consumption Results in Deficient Bone Repair in Rats. *Alcohol and alcoholism*, *37*(1), 13-20.
- Chappell, T. D., Margret, C. P., Li, C. X., & Waters, R. S. (2007). Long term effects of prenatal alcohol exposure (PAE) on the size of the whisker representation on juvenile in adult rats barrel cortex. *Alcohol* *41*(4), 239-251.
- Chernoff, G. F. (1977). The fetal alcohol syndrome in mice: An animal model. *Teratology*, *15*, 223-229.
- Church, M. W., & Abel, E. L. (1998). Fetal alcohol syndrome. Hearing, speech, language, and vestibular disorders, *Obstet. Gynecol. Clinical North American*, 85- 97.
- Church, M. W., Abel, E. L., Kaltenbach, J. A., & Overbeck, G. W. (1996). Effects of prenatal alcohol exposure and aging on auditory function in the rat: preliminary results. *Journal of Alcoholism: Clinical Experimental Research* *20*, 172- 179.

- Ciccocioppo, R., Angeletti, S., Chhada, M., Perfumi, M., Froidi, M., & Massi, M. (1999). Conditioned Taste Aversion Induced by Ethanol in Alcohol-Preferring Rats: Influence of the Method of Ethanol Administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *64*(3), 563-566.
- Coffin, J. M., Baroody, S., Schneider, K., & O'Neill, J. (2005). Impaired cerebellar learning in children with prenatal alcohol exposure: a comparative study of eyeblink conditioning in children with ADHD and dyslexia. *Cortex*, *41*, 389-398.
- Coles, C. D. (1994). Critical periods for prenatal alcohol exposure: Evidence from animal and human studies. *World Alcoholism Health Research* 1822-1829.
- Coles, C. D., & Miller, M. W. (1992). *Prenatal alcohol exposure and human development*. New York: John Wiley & Sons.
- Collins, A. C., Yeager, T. N., Lebscock, M. E., & Panter, S. S. (1975). Variations in alcohol metabolism: Influence of age and sex. *Pharmacological Biochemical Behavioral* *3*, 973- 978.
- Cook, C. D., Biddlestone, L., Coop, A., & Beardsley, P. M. (2006). Effects of combining ethanol (EtOH) with gamma-hydroxybutyrate (GHB) on the discriminative stimulus, locomotor, and motor-impairing functions of GHB in mice. *Psychopharmacology* *185*, 112-122.
- Cook, J. D. (2003). Biochemical markers of alcohol use in pregnant woman. *Clinical Biochemistry*, *36*(1), 9-19.
- Da Silva, V. A., Ribeiro, M. J., & Masur, J. (1980). Developmental, behavioral and pharmacological characteristics of rat offspring from mothers receiving ethanol during gestation and lactation. *Developmental psychobiology*(13), 653-660.
- Dawson, G. R., & Tricklebank, M. D. (1995). Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Current Technique*, *16*, 33-36.
- Decarli, L. M., & Lieber, C. S. (1967). Fatty Liver in the Rat after Prolonged Intake of Ethanol with a Nutritionally Adequate New Liquid Diet. *The Journal of Nutrition*, *91*.
- Desroches, D., Orevillo, C., & Verina, D. (1995). Sex- and strain-related differences in first-pass alcohol metabolism in mice. *Alcohol*, *12*, 221- 226.
- Dreosti, I. E. (1993). Nutritional factors underlying the expression of the fetal alcohol syndrome. *Annual New York Academy Science*, *678*, 193-204.
- Driscoll, C. D., Streissguth, A. P., & Riley, E. P. (1990). Prenatal alcohol exposure: Comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicology and Teratology*(12), 231-237.
- Eckardt, M. J., File, S. E., Gessa, G. L., Grant, K. A., Guerri, C., Hoffman, P. L., et al. (1998). Effect of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcoholic Clinical Experimental Research*, *22*, 998-1040.
- Edwardsson, S. (1988). *Microorganismos associados à cárie*. São Paulo: Thylstrup, A & Fejerskov, O.

- Endres, M., Toso, L., Roberson, R., Park, J., Abebe, D., Poggi, S., et al. (2005). Prevention of alcohol-induced developmental delays and learning abnormalities in a model of fetal alcohol syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *193*, 1028-1034.
- Ernst, M., Robinson, M. L., & Moolchan, E. T. (2001). Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*(4), 630-641.
- Faas, A. E., Spontón, E. D., Moya, P. R., & Molina, J. C. (2000). Differential responsiveness to alcohol odor in human neonates: effects of maternal consumption during gestation. *Alcohol*, *22*, 7-17.
- Falconer, J. (1990). The effect of maternal ethanol infusion on placenta blood flow and fetal glucose metabolism in sheep. *Alcohol & Alcohol* *25*, 413-416.
- Ferguson, C. P., Holson, S. A., Allen, R. R., & Paule, M. G. (1995). Prenatal ethanol exposure in rats: Long-lasting effects on learning. *Neurotoxicology and Teratology*, *17*(5), 545-552.
- Ferrari, F., Gabrielli, P. R. M., & Mello, M. A. R. (1992). Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe - feto. Um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. *Alimentação e Nutrição*, *4*, 45-56.
- Fiebre, N. C., & Fiebre, C. (2003). Freely accessible water does not decrease consumption of ethanol liquid diets. *Alcohol* *29*, 61-68.
- File, S. (1996). Recent developments in anxiety, stress and depression. . *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *54*, 3-12.
- Fiorentin, C., & Vargas, D. (2006). O uso de álcool entre gestantes e os seus conhecimentos sobre o efeito de álcool no feto. *Revista Eletrônica de Saúde Mental Álcool e Drogas - SMAD*, *2*.
- Gallo, P. V., & Weinberg, J. (1982). Neuromotor development and response inhibition following prenatal ethanol exposure. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, *4*, 505-513.
- Gerrish, C. J., & Alberts, J. R. (1995). Differential influence of adults and juvenile conspecifics on feeding by weanling rats (*rattus norvegicus*): A size-related explanation. *Jornal of Comparative Psychology*, *109*, 61-67.
- Gibson, M. A. S., Butters, N. S., Reynolds, J. N., & Brien, J. F. (2000). Effects of chronic prenatal ethanol exposure on locomotor activity, and hippocampal weight, neurons, and nitric oxide synthase activity of the young postnatal guinea pig. *Neurotoxicology and Teratology* *22*, 183-192
- Gilbertson, R. J., & Barron, S. (2005). Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacology and Biochemical Behaviour*(81), 54-64.
- Giles, S., Boehm, P., Brogan, C., & Bannigan, J. (2008). The effects of ethanol on CNS development in the chick embryo. *Reproductive Toxicology*, *25*, 224-230.

- Gottesfeld, Z., & Silverman, P. B. (1990). Developmental delays associated with prenatal alcohol exposure are reversed by thyroid hormone treatment. *Neuroscience Letter* 109(1-2), 42-47.
- Götz, A. A., & Stefanski, V. (2007). Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiology & Behavior*, 90, 108-115.
- Götz, A. A., Wittlinger, S., & Stefanski, V. (2007). Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events. *Journal of Neuroimmunology*, 185, 95-102.
- Götz, A. A., Wolf, M., & Stefanski, V. (2008). Psychosocial maternal stress during pregnancy: Effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats. *Physiology & Behavior*, 93, 1055-1060.
- Grenby, T. H., & Mistry, M. (2000). Properties of maltodextrins and glucose syrups in experiments in vitro and in the diets of laboratory animals, relating to dental health. *British Journal of Nutrition*, 84, 565-574.
- Hannigan, J. H. (1996). What Research with Animals Is Telling Us about Alcohol-Related Neurodevelopmental Disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 55(4), 489-499.
- Hannigan, J. H., Abel, E. L., & Kruger, M. L. (1993). "Population" characteristics of birthweight in an animal model of alcohol-related developmental effects. *Neurotoxicology and Teratology*, 15, 97-105.
- Heil, S. H., & Subramanian, M. G. (2000). Chronic alcohol exposure and lactation: extended observations. *Alcohol*, 21, 127-132.
- Hellemans, K. G., Verma, P., Yoon, E., Yu, W., & Weinberg, J. (2008). Prenatal alcohol exposure increases vulnerability to stress and anxiety-like disorders in adulthood. *Alcohol Clinical Experimental Research*, 1(144), 154-175.
- Henriksen, T. B., Hjollund, N. H., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Andersson, A., Kolstad, H., et al. (2004). Alcohol Consumption at the Time of Conception and Spontaneous Abortion. *American Journal of Epidemiology*, 160(7), 661-667.
- Herrick, K., Phillips, D. I. W., Haselden, S., Shiell, A., Campbell-Brown, M., & Godfrey, K. M. (2003). Maternal Consumption of a High-Meat, Low-Carbohydrate Diet in Late Pregnancy: Relation to Adult Cortisol Concentrations in the Offspring. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(8), 3554-3560.
- Hofmann, C. E., Patyk, I. A., & Weinberg, J. (2005). Prenatal ethanol exposure: Sex differences in anxiety and anxiolytic response to a 5-HT1A agonist. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 82, 549 - 558.
- Hood, R. D., Lary, J. M., & Blacklock, J. B. (1979). Lack of prenatal effects of maternal ethanol consumption in CD-1 mice. *Toxicology*, 4, 79-82.
- Israel, Y., Oporto, B., & Macdonalds, A. D. (1984). Simultaneous Pair-Feeding system for the Administration of Alcohol-Containing Liquid Diets. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 8(5), 505-508.

- Jacobson, J., & Jacobson, S. W. (1994). Prenatal alcohol exposure and neurobehavioral development: Where is the threshold? . *Alcohol Health Research World, 1*, 30-36.
- Jacobson, J., Jacobson, S. W., & Sokol, R. (1994). Effects of Prenatal Exposure to Alcohol, Smoking and Illicit Drugs on Postpartum Somatic Growth. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 18*(2), 317-323.
- Jacobson, J., Jacobson, S. W., Sokol, R., Martier, S., Ager, J., & Kaplan-Estrin, M. (1993). Teratology Effects of Alcohol on Infants Development. *Journal of Alcoholism: Clinical ad Experimental Research, 17*(1), 174 - 183.
- Jerônimo, M. S., Filho, N. T. F., & Júnior, M. R. M. (2008). Efeitos da exposição pré-natal e pós-natal ao etanol no córtex cerebral de ratos: um estudo do neurópilo. *Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial, 44*(1), 59-64.
- Jones, K. L., Smith, D., Streissguth, A. P., & Myriantopoulos, N. C. (1974). Outcome in offsprings of cronic alcoholic women. *Lancet, 1*, 1076-1078.
- Jones, K. L., & Smith, D. W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet, 2*, 999-1001.
- Kapetanovic, I. M., Krishnaraj, R., Martin-Jimenez, T., Yuan, L., Breemen, R. B., & Lyubimov, A. (2006). Effects of oral dosing paradigms (gavage versus diet) on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Chemico-Biological Interactions 164*, 68-75.
- Katragadda, S., & Schubiner, H. (2007). ADHD in Children, Adolescents and Adults. *Primary Care Clinics in Office Practice 34*, 317-341.
- Kelly, S. J., Bonthius, D. J., & West, J. R. (1987). Developmental changes in alcohol pharmacokinetics in rats. *Alcohol, 11*, 281- 286.
- Kinsley, C. H. (1994). Developmental psychobiological influences on rodent parental behavior. *Neuroscience Biobehaviour Review, 18*, 269-280.
- Konovalov, H. V., Kovetsky, N. S., Bobryshev, Y. V., & Ashewell, K. W. S. (1997). Disorders of brain development in the progeny of mothers who used alcohol during pregnancy. *Early Human Development*(48), 153 - 166.
- Kreider, J. C., & Blumberg, M. S. (2005). Geotaxis and beyond: Commentary on Motz and Alberts (2005). *Neurotoxicology and Teratology 27*, 535 - 537.
- Kronick, J. B. (1976). Teratogenic effects of ethyl alcohol administered to pregnant mice. *American Journal Obstetric Gynecology, 124*, 676-680.
- Lancaster, F., Spiegel, K., Swineford, L., Hart, W., Mohuidin, R., & Cooper, J. (1987). Meternal Ethanol Exposure With Adequate Protein in The Diet: Influence on Offspring Development. *Nutrition Research, 7*, 375-383.
- Lazzaroni, F., Bonassi, S., Magnani, M., Calvi, A., Repetto, E., Serra, G., et al. (1993). Moderate maternal drinking and outcome of pregnancy. *European Journal Epidemiology, 9*, 599-606.
- Lieber, C. S. (1976). The Metabolism of Alcohol. *Scientific American, 234*, 25-33.
- Lieber, C. S. (1988). The influence of alcohol on nutritional status *Nutrire Review, 46*, 241-254.

- Lieber, C. S. (1991). Hepatic, Metabolic and Toxic Effects of Ethanol. *Journal of Alcoholism: Clinical Experimental Research*, 15, 573-592.
- Lieber, C. S., & DeCarli, L. M. (1989). Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcoholism*(24), 197-211.
- Linnet, K. M., Dalsgaard, S., Obel, C., Wisborg, K., Henriksen, T. B., Rodriguez, A., et al. (2003). Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Journal of Psychiatry*(160), 1028-1040.
- Lopez-Tejero, D., Ferrer, I., & Herrera, E. (1986). Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth, sensory reflex maturation and brain development in the rat. *Neuropathology Application Neurobiology*, 12, 251-260.
- Lumley, J., Correy, D. J. F., Newman, N. M., & Curran, J. T. Cigarette smoking, alcohol consumption and fetal outcome in Tasmania 1981-82. *Obstetrition Gynaecology*, 25, 33-40.
- Maier, S. E., Strittmatter, M. A., Chen, W. A., & West, J. R. (1995). Changes in blood alcohol levels as a function of alcohol concentration and repeated alcohol exposure in adult female rats: Potential risk factors for alcohol-induced fetal brain injury. *Alcoholic Clinical Experimental Research*, 19, 923- 927.
- Maior, F. N. S., Siqueira, J. S., Barbosa, M. D. S., & Almeida, R. N. (2003). Desenvolvimento Pós-natal da Prole exposta ao Extrato Hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o Período Gestacional de Ratas. *Latin American Journal Pharmacology* 22(4), 321-325.
- Mariscal, M. S., Llorca, P. J., Rez-Iglesias, R., Pardo-Crespo, R., & Guez, M. D. (2006). Pattern of Alcohol Consumption During Pregnancy and Risk for Low Birth Weight. *Association of Educational Psychologists*, 16(6), 432-438.
- Martin, J. C., Martin, D. C., Radow, D., & Sigman, G. (1976). Growth, development and activity in rat offspring following maternal drug exposure *Experimental Aging Research*, 2(3), 235 - 251
- Maurissen, J., P.J., Marable, B., R., Andrus, A., K., & Stebbins, K. E. (2003). Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology*, 25, 543-553.
- Mennella, J. A. (2001). Regulation of milk intake after exposure to alcohol in mother's milk. *Alcoholic Clinical Experimental Research*, 25, 590-593.
- Mick, E., Biederman, J., Faraone, S. V., Sayer, J., & Kleinman, S. (2002). Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *Journal of American Academy Child and Adolescence Psychiatry*(41), 378-385.
- Mikics, E., Barsy, B., Barsvari, B., & Haller, J. (2005). Behavioural specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment iin the elevated plus-maze and the open-field. *Hormons Behaviour*, 48, 152-162.
- Mitchell, J. A. (1994). Effects of alcohol on blastocyst implantation and fecundity in the rat. *Alcoholism: Clinical Experimental Research* 18, 29-34.

- Molina, J. C., Spear, N. E., Spear, L. P., Mennella, J. A., & Lewis, M. J. (2007). Alcohol and development: Beyond Fetal Alcohol Syndrome. *Developmental Psychobiology*, *49*, 227-242.
- Momino, W., Sanseverino, M. T., & Schüler-Faccini, L. (2008). Prenatal alcohol exposure as a risk factor for dysfunctional behaviors: the role of the pediatrician. *Jornal de Pediatria*, *84*(4).
- Moore, C. L., & Rogers, S. A. (1984). Contribution of selfgrooming to onset of puberty in male rat. *Developmental Psychology*, *19*, 427-438.
- Morgan, M. A., & Pfaff, D. W. (2001). Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Hormons Behaviour*, *40*, 472-482.
- Mothes, K., Optiz, B., Werner, R., & Clausing, P. (1996). Effects of Prenatal Ethanol Exposure and Early Experience on Home-Cage and Open-Field Activity in Mice *Neurotoxicology and Teratology*, *18*(1), 59-65.
- Motz, B. A., & Alberts, J. R. (2005). The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicology and Teratology*, *27*, 529-533.
- Numan, M., Roach, J. K., Del Cerro, M. C., A., G., Govia, S., & Sheehan, T. P. (1999). Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Research*, *830*, 358-371.
- Ouellette, E. M., & Rosett, H. L. (1976). A pilot prospective study of the alcohol syndrome at the Boston City Hospital II. *The Infants*, *273*, 123-129.
- Padovan, C. M., Del Bel, E. A., & Guimarães, F. S. (2000). Behavioral effects in the elevated plus-maze of an MSDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *67*, 325-330.
- Palmer, R. H., Ouellette, E. M., Warner, L., & Leichtman, S. R. (1974). Congenital malformations in offsprings os a chronic alcoholic mother. *Pediatrics*, *53*, 490-494.
- Pellis, S. M., & Pellisa, V. C. (1994). Development of righting when falling from a bipedal standing posture: Evidence for the dissociation of dynamic and static righting reflexes in rats *Physiology & Behavior*, *4*(4), 659-663
- Pepino, M. Y., López, M. F., Spear, N. E., & Molina, J. C. (1998). Infant rats respond differently to alcohol after nursing from an alcohol-intoxicated dam. *Alcohol*, *18*, 189-201.
- Pometlova, M., Hrubá, L., Lamberova, R. S., & Rokyta, R. (2009). Cross-fostering effect on postnatal development of rat pups exposed to methamphetamine during gestation and preweaning periods. *Journal of Developmental Neuroscience* 149-155.
- Potter, B. M., & Berntson, G. G. (1987). Prenatal alcohol exposure: effects on acoustic startle and prepulse inhibition. *Neurotoxicology and Teratology*, *9*, 17-21.
- Preedy, V. R., McIntosh, A., Bonner, A. B., & Peters, T. J. (1996). Ethanol dosage regimes in studies of ethanol toxicity: influence of nutrition and surgical interventions. *Addiction Biology*(1), 255-262.

- Primates, P., Del Corno, G., Bonazzi, M. C., & Waters, W. E. (1993). Alcohol and pregnancy: An international comparison. *Journal Public Health Medicine* 15, 69-76.
- Pueta, M., Abate, P., Haymal, O. B., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2008). Ethanol exposure during late gestation and nursing in the rat: Effects upon maternal care, ethanol metabolism and infantile milk intake. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 91, 21-31.
- Randall, C. L., & Taylor, W. J. (1979). Prenatal ethanol exposure in mice: Teratogenic effects. *Teratology*, 19, 305-311.
- Rao, G. A., & Larkin, E. C. (1985). Inadequate intake by growing rats of essential nutrients from liquid diets used for chronic alcohol consumption. *Nutrition Research*, 5(5), 789-796
- Riesenfeld, A., & Oliva, H. (1987). The effect of nicotine and alcohol on the fertility and life span of rats. A cytological analysis. *Acta Anatomica (Basel)* 128, 45-50.
- Riley, E. P. (1990). The long-term behavioral effects of prenatal alcohol exposure in rats. *Alcoholism: Clinical Experimental Research*, 14, 670-673.
- Riley, E. P., Barron, S., Melcer, T., & Gonzales, D. (1993). Alterations in Activity Following Alcohol Administration During the Third Trimester Equivalent in P and NP Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 17(6), 1240-1245.
- Robert, R. A., & Scott, O. R. (2002). *Princípios fundamentais de fisiologia do exercício para aptidão, desempenho e saúde*. São Paulo: Phorte.
- Rosett, H. L., Ouellette, E. M., Weiner, L., & Owens, E. (1978). Therapy of heavy drinking during pregnancy. *Obstetric and Gynecology*, 51, 41-46.
- Rosman, N. P., & Malone, M. J. (1976). An experimental study of the fetal alcohol syndrome. *Neurology*, 26, 365.
- Sanchis, R., Sancho-Tello, M., & Guerri, C. (1988). The role of Liquid Diet Formulation in the Postnatal Ethanol Exposure of rats via Mother's Milk. *American Institute of nutrition*.
- Sandler, M. M. D. (1980). *Psychofarmacology of Alcohol*. New York: Raven Press.
- Sant'anna, L. B. (2001). *Efeitos da ingestão do álcool durante a gestação na imunoexpressão do EGF na amelogenese e dentinogenese do 1º molar inferior de ratos*. Unpublished Mestrado, Universidade Estadual de Campinas Campinas.
- Santos, N. S. S., Biscaro, M. D. A., Santos, B. C. L., & Moraes, S. G. (2009). Congenital malformations in embryos of female mice exposed to alcohol and nicotinamide. *Einstein*, 1, 52-57
- Schenker, S., Becker, H. C., Randall, C. L., Phillips, D. K., Baskin, G. S., & Henderson, G. (1990). Fetal alcohol syndrome: Current status of pathogenesis. *Alcoholism: Clinical Experimental Research* 14, 635-647.

- Schour, I. (1934). The hypophysis and the teeth. The replacement therapy on the eruption and histologic changes of the teeth of the hypophysectomized rat *Angle Orthodontic*, 4(142).
- Severino, G. S., Fossati, I. A. M., Padoina, M. J., Gomes, C. M., Trevizan, L., Sanvitto, G. L., et al. (2004). Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiology & Behavior*, 81, 489– 498.
- Shankar, K., Ronis, M. J. J., & Badger, T. M. (2007). Effects of Pregnancy and Nutritional Status on Alcohol Metabolism. *Alcohol Research & Health*, 30(1), 55-59.
- Sigh, S., & Snyder, A. K. (1982). Ethanol Ingestion during Pregnancy: Effects on Pregnant Rats and Their Offspring. *Journal of Nutrition*, 112(1), 98-103.
- Silva, V. A. (2000). Ambiente e Desenvolvimento: Efeitos do Álcool Etílico e da Desnutrição. *Mundo&Vida*, 2(1), 1-27.
- Sternberg, W. F., & Ridgway, C. G. (2003). Effects of gestational stress and neonatal handling on pain, analgesia, and stress behavior of adult mice. *Physiology & Behavior*, 78, 375– 383.
- Stratton, J., & Gailfus, D. (1998). A New Approach to Substance Abuse Treatment Adolescents and Adults With ADHD. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 15(2), 89–94.
- Stratton, J., Howe, C., & Battaglia, F. T. (1996). Fetal alcohol syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention and treatment. *Washington, D.C.: National Academy Press*.
- Streissguth, A. P., Barr, H. M., Kogan, J., & Bookstein, F. L. (1996). *Understanding the occurrence of secondary disabilities in clients with fetal alcohol syndrome (FAS) and fetal alcohol effects (FAE)*. . Paper presented at the Fetal Alcohol & Drug Unit;, Seattle: University of Washington.
- Streissguth, A. P., Herman, C. S., & Smith, D. W. (1978). Intelligence, behavior, and dysmorphogenesis in the fetal alcohol syndrome: A report on 20 patients. *The Journal of Pediatrics*, 92(3), 363-367.
- Streissguth, A. P., Landesman-Dwyer, S., Martins, J. C., & Smith, D. (1980). Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science*, 209(4454), 353-361.
- Subramanian, M. G. (1995). Effects of chronic alcohol administration on lactational performance in the rat. *Alcohol* 12, 137–143.
- Tazumi, T., Hori, E., Uwano, T., Umeno, K., Tanebe, K., Tabuchi, E., et al. (2005). Effects of prenatal maternal stress by repeated cold environment on behavioral and emotional development in the rat offspring. *Behavioural Brain Research*, 162, 153–160.
- Thilstrup, A., & Fejerskov, O. (2001). *Cariologia Clínica* (2 ed.). São Paulo: Editora Santos.
- Thomas, J. D., Abou, E. J., & Dominguez, H. D. (2009). Prenatal choline supplementation mitigates the adverse effects of prenatal alcohol exposure on development in rats. *Neurotoxicology and Teratology Article in Press*.

- Thylstrup, A., & Fejerskov, O. (2001). *Cariologia Clínica* (R. L. M. Sonia, Trans. 2 ed.). São Paulo.
- Treit, D. (1985). Animal model for study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience Biobehaviour Review*, *9*, 203-222.
- Tripp, G., & Wickens, J. R. (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* *57*, 579-589.
- Tze, W. J., & Lee, M. (1977). Adverse effects of maternal alcohol consumption on pregnancy and foetal growth in rats. *Nature* *257*, 479-480.
- Ulleland, C. N. (1972). The offsprings of alcoholic mother. *New York Academy Science*, *197*, 167-169.
- Uzbay, T., & Kayaalp, O. S. (1995). A modified liquid diet of chronic ethanol administration: validation by ethanol withdrawal syndrome in rats *Pharmacological Research*, *31*(1).
- Vieira, M. L. (2003). *Comportamento materno e paterno em roedores*. Unpublished Mestrado, UFSC - Trindade, FLorianópolis.
- Vorhees, C. V., & Fernandez, K. (1986). Effects of short-term prenatal alcohol exposure on maze, activity, and olfactory orientation performance in rats. *Neurobehaviour Toxicology and Teratology*, *8*, 23-28.
- Walf, A., & Frye, C. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, *2*(2).
- Webster, W. S., Walsh, D. A., Lipson, A. H., & McEwen, S. E. (1980). Teratogenesis after acute alcohol exposure in inbred and outbred mice. *Neurobehavioral Toxicology* *2*, 227-234.
- Weinberg, J., D'Alquen, G., & Bczio, S. (1990). Interactive effects of ethanol intake and maternal nutritional status on skeletal development of fetal rats. *Alcohol* *7*, 383-388.
- Weinberg, J., Sliwowska, J. H., Lan, N., & Hellemans, K. G. C. (2008). Prenatal Alcohol Exposure: Foetal Programming, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Sex Differences in Outcome. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*, 470-488.
- West, J. R., & Goodlett, C. R. (1990). Teratogenic effects of alcohol on brain development. *Annual Medicine*, *22*, 319-325.
- West, J. R., Goodlett, C. R., Bonthius, D. J., Hamrc, K. M., & Marcussen, B. L. (1990). Cell population depletion associated with fetal alcohol brain damage: Mechanisms of BAC-dependent cell loss. *Alcoholism: Clinical Experimental Research*, *14*, 813-818.
- Whishaw, I. Q., & Kolb, B. (2005). *The behavior of the laboratory rat*. Oxford: Oxford University press.
- Wiener, S., Shoemaker, W. I., Koda, L. Y., Bloom, F. E., & 1981. (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.

- Williams, M. T., Hennessy, M. B., & Davis, H. N. (1998). Stress During Pregnancy Alters Rat Offspring Morphology and Ultrasonic Vocalizations. *Physiology & Behavior*, *63*(3), 337-343.
- Wong, D. V. T., Ferreira, J. R. O., Fonteles, M. M. F., Viana, G. S. B., Souza, F. C. F., & Vasconcelos, S. M. M. (2008). Álcool e neurodesenvolvimento: aspectos genéticos farmacológicos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, *5* (1), 8-23.
- Zimmerberg, B., Sukel, H. L., & Stekler, J. D. (1991). Spatial learning of adult rats with fetal alcohol exposure: Deficits are sex-dependent. *Behaviour Brain Research*, *42*, :49-56.