



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ana Cristina Chagas Carvalho Nogueira

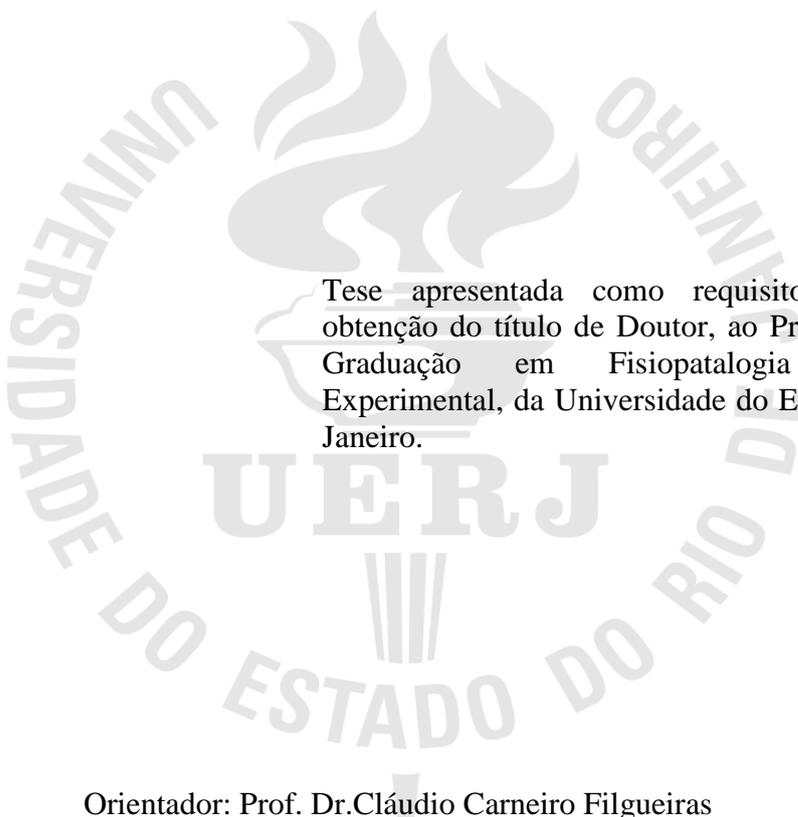
**Efeitos da cafeína na manifestação dos déficits neurocomportamentais  
decorrentes da exposição ao etanol durante o desenvolvimento**

Rio de Janeiro

2018

Ana Cristina Chagas Carvalho Nogueira

**Efeitos da cafeína na manifestação dos déficits neurocomportamentais decorrentes da  
exposição ao etanol durante o desenvolvimento**



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N778 Nogueira, Ana Cristina Chagas Carvalho.  
Efeitos da cafeína na manifestação dos déficits neurocomportamentais decorrentes da exposição ao etanol durante o desenvolvimento/ Ana Cristina Chagas Carvalho Nogueira. – 2018.  
98 f.

Orientador: Cláudio Carneiro Filgueiras.

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Etanol – Efeitos adversos - Teses. 2. Cafeína - Teses. 3. Alcoolismo – Teses. 4. Plasticidade Neuronal. 5. Estresse Oxidativo – Teses. I. Filgueiras. Cláudio Carneiro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.89-008.47

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Ana Cristina Chagas Carvalho Nogueira

**Efeitos da cafeína na manifestação dos déficits neurocomportamentais decorrentes da  
exposição ao etanol durante o desenvolvimento**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-  
Graduação em Fisiopatologia Clínica e  
Experimental, da Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro.

Aprovada em 21 de novembro de 2018.

Orientador: Prof.Dr. Claudio Carneiro Filgueiras

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana da Cunha Faria Melibeu

Universidade Federal Fluminense

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Campello Costa Lopes

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Faculdade de Formação de Professores - UERJ

Rio de Janeiro

2018

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, meu porto seguro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à **Deus**, por me permitir mais esse momento na minha vida, me dando condições e meios de seguir em frente apesar de todos os obstáculos que surgiram.

Aos **meus amados pais**, que me além de todo o amor proporcionado a mim, me ensinaram a sempre ir atrás dos meus objetivos e a superar os meus limites, a sonhar sem me perder da realidade e a dar a volta por cima quando necessário.

À minha **irmã Paula**, quem eu amo muito e sempre foi e será um porto seguro na minha vida, grande amiga e parceira nas horas vagas.

Ao meu marido **Ivo Nogueira**, quem me acompanhou desde o início dessa fase da minha vida dando todo o suporte possível para que eu prosseguisse e seguisse em frente.

À minha segunda família, **Tia Maria e Janaina (Nana)**, que estão sempre junto, me acompanhando e ajudando no meu dia-a-dia e nos momentos de descontração em família. Vocês fazem muito parte da minha vida.

À minha, parceira, cúmplice, exemplo, irmã de coração e espiritual, **Ana Heloísa**, pelos almoços intermináveis e conselhos.

À minha amiga de graduação **Karla Pêpe**, que acabou se tornando a minha principal parceira no dia-a-dia do laboratório, apesar de não sermos colaboradoras diretas de projeto.

Ao meu amigo e colaborador **André Nunes Freitas**, sendo essencial para que esse projeto fosse concluído.

Ao **Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE)**, em especial a **Prof<sup>a</sup> Dra Patrícia Lisboa** e, em especial, a **Pós-doc Nayara Peixoto** pela colaboração no projeto, quem pode me ceder um pouco do seu conhecimento sobre as técnicas de estresse oxidativo e ter paciência para me passá-las, mesmo quando precisou estar distante.

Ao **Laboratório de Neurofisiologia da UERJ** que me acolheu há quase 9 anos atrás me proporcionando a oportunidade de crescer profissionalmente, me ensinando a fazer e produzir ciência.

Por último, mas de forma alguma menos importante, ao meu orientador **Prof.Dr Claudio Carneiro Filgueiras**. Eu não tenho palavras de como o seu apoio e compreensão foram importantes nesses últimos anos de tantas reviravoltas pessoais na minha vida e ainda assim fazendo com que fosse possível a conclusão desse projeto.

## RESUMO

NOGUEIRA, Ana Cristina Chagas Carvalho. **Efeitos da cafeína na manifestação dos déficits neurocomportamentais decorrentes da exposição ao etanol durante o desenvolvimento**. 2018. 98 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O etanol e a cafeína estão entre as substâncias neuroativas mais consumidas no mundo. Enquanto o consumo de cafeína é considerado seguro, o consumo de etanol durante a gestação é responsável por uma série de distúrbios neurocomportamentais em crianças e adolescentes. Apesar das evidências epidemiológicas do uso combinado de cafeína e etanol por gestantes, as interações entre estas substâncias têm recebido pouca atenção em estudos experimentais. Nesse estudo avaliamos os efeitos da co-exposição às duas drogas durante o desenvolvimento na ansiedade, na memória e aprendizado, na atividade natatória e nos níveis de estresses oxidativo no córtex. Para tanto, camundongos Suíços foram expostos do primeiro dia gestacional até o vigésimo primeiro dia pós-natal (PN21) a solução de cafeína 0,1 g/l (CAF1), a solução de cafeína 0,3 g/l (CAF3) ou tiveram acesso livre à água potável (CAF0). Em dias alternados de PN2 a PN8, os animais de cada ninhada receberam uma injeção intraperitoneal de 0,25 µl/g de etanol (grupo ETOH25), 0,5 µl/g de etanol (grupo ETOH50) ou de solução salina (grupo ETOH0). Os testes comportamentais foram realizados entre PN30 e PN35. Os níveis de ansiedade foram avaliados por 5 minutos no labirinto em cruz elevado (LCE), a memória e aprendizado pelo teste de esquiwa passiva e o comportamento rotacional foi avaliado no nado forçado. O estresse oxidativo foi avaliado pelas medidas das espécies reativas ao ácido tiobarbutúrico (TBARS), da capacidade antioxidante (DPPH) e da carbonilação de proteínas em PN9 e PN30. No LCE, os animais do grupo ETOH50 foram menos ansiosos que os dos grupos ETOH25 e SALINA. Na esquiwa passiva, apenas os machos expostos ao etanol tiveram prejuízo na memória e aprendizado. No nado forçado, os animais expostos a maior dose de cafeína apresentaram menor número de deslocamentos angulares e os animais expostos a maior dose de etanol apresentaram maior número de deslocamentos angulares. Em todos os testes comportamentais, os efeitos do etanol foram menos evidentes no grupo de animais expostos a maior dose de cafeína. De modo geral, a exposição à cafeína teve efeito antioxidante e a exposição ao etanol não foi capaz de afetar os níveis de estresse oxidativo. Nossos dados corroboram os estudos que mostraram que a exposição precoce ao etanol promove uma série de distúrbios neurocomportamentais. Além disso, a exposição gestacional à cafeína pode desempenhar um papel protetor nos danos causados pela exposição precoce ao etanol.

Palavras-chave: Alcoolismo. Cafeína. Ansiedade. Neuroplasticidade. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

NOGUEIRA, Ana Cristina Chagas Carvalho. **Effects of caffeine in the manifestation of neurobehavioral deficits induced by ethanol exposure during development.** 2018. 98f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Ethanol and caffeine are two of the most consumed neuroactive drugs in the world. While caffeine consumption is considered safe, ethanol consumption during pregnancy is responsible for a number of neurobehavioral disorders in children and adolescents. In spite of the epidemiological evidence of the combined use of caffeine and ethanol by pregnant women, the interactions between these two drugs have received little attention in experimental studies. In the current study, we analyzed the effects of co-exposure to caffeine and ethanol during development on the anxiety-like behavior, learning and memory, rotational behavior and cortical levels of oxidative stress of mice. In this sense, Swiss mice were exposed from the first gestational day to the 21st postnatal (PN21) day to one of three solutions: 1) a solution containing caffeine 0.1 g/l (group CAF1); 2) a solution containing caffeine 0.3g/l (group CAF3); 3) filtered tap water (group CAF0). Every other day, from PN2 to PN8, animals in each litter were i.p injected with one of the following solutions: 1) 0.25 µl/g ethanol (group ETOH25); 2) 0.5 µl/g ethanol (group ETOH50); 3) saline solution (group ETOH0). The behavioral tests were performed between PN30 and PN35. The anxiety-like behavior was evaluated in the locomotor activity was analyzed in the elevated plus maze test (EPM). The passive avoidance test was used to assess learning and memory. The rotational behavior was assessed in the free-swimming test. On PN9 and PN30, the oxidative stress was evaluated by the measurements of thiobarbuturic acid reactive species (TBARS), antioxidant capacity (DPPH) and protein carbonylation. In EPM, animals from the ETOH50 group were less anxious than those from the ETOH25 and SALINE groups. In passive avoidance, a learning and memory impairment were observed only in males exposed to ethanol. In the free-swimming test, mice exposed to the higher dose of caffeine had fewer angular displacements and mice exposed to the higher dose of ethanol had a greater number of angular displacements. Of note, the effects of ethanol were less evident in the group animals exposed to higher caffeine dose in all behavioral tests. Regarding oxidative stress assays, while the exposure to caffeine had an antioxidant effect and exposure to ethanol was not able to affect oxidative stress levels. Our data corroborate studies that show that early exposure to ethanol promotes a number of neurobehavioral disorders. In addition, gestational exposure to caffeine may play a protective role in the manifestation of neurobehavioral deficits caused by early exposure to ethanol.

Keywords: Alcoholism. Caffeine. Anxiety. Neuroplasticity. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismos celulares por trás da ação do etanol.....	14
Figura 2 -	Representação da fórmula estrutural da molécula de etanol.....	15
Figura 3 –	Representação da fórmula estrutural da molécula de cafeína.....	17
Figura 4 -	Curvas de crescimento da massa cerebral de humanos e roedores durante o desenvolvimento .....	20
Figura 5 -	Esquema de umas das formas de como são formadas as EROs.....	26
Figura 6 -	Equação de Haber-Weiss Fenton.....	27
Figura 7 -	Efeitos do etanol na atividade locomotora.....	30
Figura 8 -	Grupos experimentais.....	35
Figura 9 -	Esquema do Labirinto em Cruz Elevado.....	36
Figura 10	Step-Down.....	37
Figura 11 -	Esquema do aparato utilizado para o teste de nado forçado.....	38
Figura 12 -	Esquema utilizado para a contagem dos deslocamentos angulares.....	39
Figura 13 -	Esquema do tratamento adotado no estudo do estresse oxidativo.....	40
Figura14 -	Massa corporal dos animais durante a exposição ao etanol.....	47
Figura 15 -	Massa corporal dos animais em PN30 .....	48
Figura 16 -	Número de entradas nos braços fechados do LCE.....	49
Figura 17 –	Comportamento associado à ansiedade entre machos e fêmeas por grupo CAF.....	50
Figura 18 -	Labirinto em Cruz Elevado com todos os animais.....	51
Figura 19 -	Latência para descida da plataforma no teste de esquiiva passiva.....	52
Figura 20 -	Latência para descida da plataforma no teste de esquiiva passiva separado por machos e fêmeas.....	53
Figura 21 -	Diferença entre as latências da segunda para a primeira sessão do teste de esquiiva passiva (DIF).....	54
Figura 22 -	Percentual da diferença entre as latências da segunda para a primeira sessão do teste de esquiiva passiva (%DIF).....	55
Figura 23 -	Diferença (DIF) e percentual da diferença (%DIF) entre as latências da segunda para a primeira sessão do teste de esquiiva passiva.....	56
Figura 24 -	Número total de deslocamentos angulares no teste de nado livre.....	57
Figura 25 -	Atividade total rotacional de todos os animais.....	58
Figura 26 -	Índices de magnitude da lateralidade rotacional: módulo da diferença	

	entre o número de rotações para esquerda e direita (NET) e percentual de deslocamento para o lado preferido (%LP).....	59
Figura 27 -	Dados de TBARS em neonatos.....	60
Figura 28 -	Dados de TBARS em pré-púberes.....	61
Figura 29 -	Dados DPPH em animais neonataos e pré púberes.....	62
Figura 30 -	Dados de proteína carbonilada em neonatos e pré-púberes.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais Oxidantes Endógenos.....	27
Tabela 2 –	Consumo médio de cafeína durante 21 dias de exposição.....	45
Tabela 3 -	Taxa de mortalidade e de sobrevivência dos animais dos grupos expostos a cafeína e etanol.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sub>1</sub>	Receptor adenosina do subtipo A
A <sub>2A</sub>	Receptor adenosina do subtipo A2A
BEC	Concentração de etanol no sangue
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
DNA .....	Ácido Desoxirribonucleico
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FASD	Fetal Alcohol Spectrum Disorder
FLSD	Fisher's Least Significant Difference Test
GD5-20 .....	Dia Gestacional 5 ao 20 (Gestacional Day)
GD6-16 .....	Dia Gestacional 6 ao 16 (Gestacional Day)
G1	Primeiro dia gestacional
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABAA	Receptor ácido gama-aminobutírico do subtipo A
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MDAs	Malondialdeídos
N	Número amostral
NIH .....	National Institutes of Health
NMDA .....	N-metil-D-Aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Valor de prova
PN	Dia de vida pós natal
uANOVA	Análise de Variância univariada
rANOVA	Análise de Variância com repetição
SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration
SODs	Superóxido Dismutases
SNC .....	Sistema Nervoso Central
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
2.1	<b>Animais</b> .....	33
2.2	<b>Exposição à cafeína</b> .....	33
2.3	<b>Exposição ao etanol</b> .....	34
2.4	<b>Taxa de mortalidade</b> .....	35
2.5	<b>Análise comportamental</b> .....	35
2.5.1	<u>Teste Labirinto em Cruz Elevado</u> .....	35
2.5.2	<u>Teste da esquiva inibitória (<i>Step-down Passive Avoidance</i>)</u> .....	36
2.5.3	<u>Teste do Nado Livre</u> .....	37
2.6	<b>Análises bioquímicas do estresse oxidativo</b> .....	40
2.6.1	<u>Homogeneizado do córtex</u> .....	41
2.6.2	<u>Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre <i>Di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium (DPPH)</i></u> .....	41
2.6.3	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u> .....	42
2.6.4	<u>Determinação de proteínas carboniladas</u> .....	42
2.7	<b>Análises estatística</b> .....	43
3	<b>RESULTADOS</b> .....	45
3.1	<b>Consumo de líquido</b> .....	45
3.2	<b>Taxa de mortalidade</b> .....	45
3.3	<b>Massa corporal</b> .....	46
3.4	<b>Análise comportamental</b> .....	48
3.4.1	<u>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</u> .....	48
3.4.2	<u>Esquiva Passiva</u> .....	51
3.4.3	<u>Comportamento rotacional de nado livre</u> .....	56
3.5	<b>Análise Bioquímica do Estresse Oxidativo no córtex cerebral</b> .....	60
3.5.1	<u>TBARS</u> .....	60
3.5.2	<u>DPPH</u> .....	61
3.5.3	<u>ProteínaCarbonilada</u> .....	62
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
4.1	<b>Resumo dos resultados</b> .....	64

4.2	<b>Vias de administração das substâncias.....</b>	66
4.3	<b>Efeitos da cafeína e do etanol no ganho de massa corpórea.....</b>	67
4.4	<b>A cafeína afetou de modo dependente do sexo o comportamento no LCE.....</b>	69
4.5	<b>A exposição ao etanol reduziu o comportamento associado a ansiedade.....</b>	70
4.6	<b>A exposição ao etanol afetou o comportamento na esquiva passiva.....</b>	72
4.7	<b>A exposição ao etanol aumentou a atividade natatória e a lateralidade rotacional no teste de nado livre.....</b>	75
4.8	<b>A exposição ao etanol aumentou a lateralidade rotacional no teste de nado livre.....</b>	76
4.9	<b>A exposição ao etanol não afetou os níveis de estresse oxidativo no córtex.....</b>	77
4.10	<b>A exposição à cafeína reduziu os níveis de estresse oxidativo e promoveu uma leve diminuição dos efeitos comportamentais da exposição neonatal etanol.....</b>	77
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	80
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	81

## INTRODUÇÃO

### Efeitos do álcool no sistema nervoso central

O tecido nervoso é uma das estruturas mais sensíveis aos efeitos teratogênicos do etanol e, conseqüentemente, o consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação produz um amplo espectro de déficits neurológicos e comportamentais que podem persistir ao longo da vida (Hannigan and armant, 2000; Spohr et al., 2007; Welch-Carre E, 2005). Dentre os distúrbios neurocomportamentais mais frequentemente observados em crianças e adolescentes estão o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Burd et al., 2003) e os déficits de memória e aprendizado (Acheson SK et al., 2001; Harris et al., 1995). Estima-se que a comorbidade das crianças diagnosticadas com FASD e TDAH é de cerca de 41% (Bhatara et al., 2006). Desordens do espectro autista, distúrbios de ansiedade e depressão também têm sido descritos em crianças com FASD (Stevens et al., 2013; Hellemans et al., 2010).

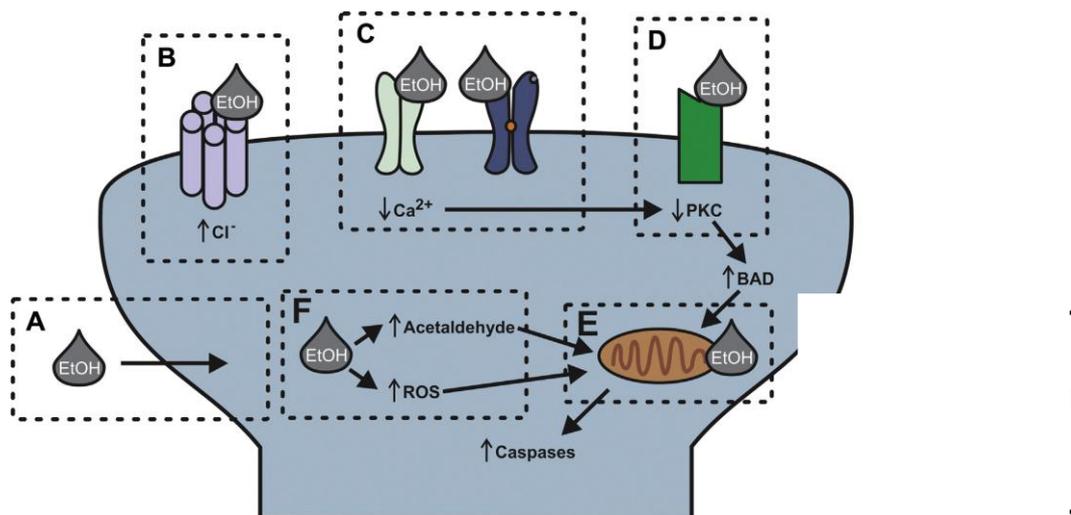
Estudos em humanos tem sugerido que o estabelecimento de assimetrias cerebral parece ser afetado pela exposição ao etanol durante a gravidez, como foi demonstrado por estudos de imagem in vivo publicados na última década (Niccols, 2007; Riley et al., 2004; Sowell et al., 2008). Por exemplo, indivíduos expostos ao álcool apresentaram redução significativa da assimetria da substância cinzenta da superfície cortical no lobo temporal (Riley et al., 2004), volume de hipocampo esquerdo menor quando comparado ao direito (Riikonen et al., 1999), e um significante aumento na espessura do córtex frontal direito quando comparado aos controles (Niccols, 2007; Riley et al., 2004).

No sistema nervoso central (SNC), o álcool possui atuação inespecífica. Possui características polares e apolares, se tornando facilmente acessível a membranas, receptores e outras diferentes estruturas intracelulares. Seu mecanismo de ação é complexo e envolve desde a alteração da fluidez das membranas celulares até a interação com diversas proteínas de membrana (Ly e Longo, 2004; Pinsky e Bessa, 2004). Dentre as proteínas de membrana, os receptores ionotrópicos como os receptores para ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABAA) e os receptores para o glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) têm sido amplamente associados com os distúrbios neurocomportamentais causados pela exposição precoce ao etanol (Proctor et al., 2006; Sanna et al., 2004; Ikonomidou, 2000).

Particularmente, a administração aguda de etanol, de modo dose dependente, diminui a função dos receptores NMDA e aumenta a função dos receptores GABAA (Proctor et al., 2006).

Dentro da célula, o álcool pode levar ao estresse oxidativo através do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio que são extremamente prejudiciais à célula (Brocardo et al., 2011). O álcool também é capaz de ativar a via de sinalização da caspase, que lida com a fragmentação do DNA e iniciação da morte celular e neurodegeneração (Olney et al., 2002; Olney, 2004; Pascual et al., 2007). No núcleo celular, o álcool pode interferir na transcrição de fatores neutróficos (Wilkemeyer, 2002). Além disso, ele também pode alterar o mecanismo de metabolização da sinalização sináptica já que a exposição crônica ao etanol reduz notavelmente a atividade específica da enzima glutamina sintetase (Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979), importante para a desintoxicação da amônia e reposição neurotransmissora (Babu et al., 1994) (Figura 2).

Figura 1 - Representação esquemática dos mecanismos celulares por trás da ação do etanol



Legenda: Mecanismos celulares por trás da ação do etanol. (A) O álcool atravessa facilmente a bicamada lipídica causando danos na membrana. (B) Atua como agonista do receptor GABA, causando a depressão da atividade celular. (C) Adicionalmente ao sistema depressor, o álcool inibe a atividade dos receptores NMDA e dos canais de cálcio dependentes de voltagem. (D) A diminuição da regulação da expressão de receptores neutróficos e nos níveis de cálcio intracelular ativa a sinalização do mecanismo de morte celular. (E) O álcool também atua diretamente sobre a mitocôndria de forma prejudicial, complementando para a ativação do mecanismo de morte celular. (F) O metabolismo do etanol adicionalmente aos resultados tóxicos do acetaldeído e das espécies reativas de oxigênio, contribuem para um maior dano mitocondrial e celular.

Fonte: Modificado de Fontaine et al., 2016.

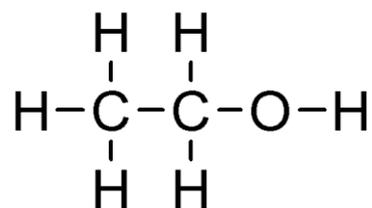
De modo geral, os efeitos deletérios manifestados devido à exposição pré-natal ao etanol podem variar de modo considerável entre indivíduos. O grau com que os déficits

neurológicos e comportamentais se manifestam parece variar em função da quantidade de etanol consumida pela mãe, da frequência e/ou padrão de consumo e dos picos de concentração alcoólica no sangue (Cartwright and Smith, 1995; Guerric, 1998; May et al., 2013; Sadrian et al., 2014). Além disso, fatores genéticos e um grande número de fatores ambientais, amplamente associados com a pobreza, tais como subnutrição, aumento do estresse, serviços de saúde e/ou sociais deficitários também podem contribuir para teratogenicidade do etanol (Hannigan et al., 2007; Zelner and Koren, 2013). De particular interesse para este estudo, uma série de substâncias, como a cafeína, pode interagir com o etanol e contribuir para o variado espectro de consequências da exposição ao etanol durante o desenvolvimento.

### Exposição gestacional ao etanol

O etanol ou álcool etílico é encontrado em bebidas alcoólicas e consiste em uma pequena molécula formada por dois sítios reativos com uma cadeia curta de carbono e um grupamento hidroxila (Figura 1). A cadeia de carbono participa de interações hidrofóbicas fracas, enquanto o grupamento hidroxila forma ligações de hidrogênio, um tipo de interação intermolecular forte. É uma substância hidrossolúvel e com rápida difusão pela barreira hematoencefálica (Scivoletto *et al.*, 2003; Bittencourt *et al.*, 2013).

Figura 2 - Representação da fórmula estrutural da molécula de etanol



Fonte: Saber Atualizado, 2018. Acessado na página <https://www.saberatualizado.com.br/2016/11/bebidas-alcoolicas-causam-cancer.html>

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o álcool é consumido praticamente em todo mundo, com estimativa de que indivíduos com idade maior ou igual a 15 anos consumiram cerca de 6,4 litros de álcool no ano de 2010 (equivalente a 13,9g por dia)

(The World Health Report, 2014). Dentro desse consumo global, as mulheres bebem 4,2L por ano, enquanto que os homens consomem a média de 13,6L. Ainda segundo a OMS, entre as mulheres, estima-se que entre 13 e 20% fazem uso de bebidas alcoólicas no período da gestação (Balachova et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009; Senecky et al., 2011). Esse dado é de extrema relevância se considerar que o etanol, substância presente nos diversos tipos de bebidas alcoólicas, é um potente agente teratogênico e atravessa livremente a placenta. Como consequência, os níveis de álcool no sangue dos bebês são semelhantes aos das mães (Hannigan e Armant, 2000; Welch-Carre, 2005). Estas características tornam o consumo de etanol por gestantes um grave problema de saúde pública. Em acordo com essa ideia, vários estudos têm associado o consumo de grandes quantidades de bebidas alcoólicas durante a gestação como a principal causa de retardo mental no mundo (Miranda RC, 2012; Rasmussen C, 2005; Spohr HL et al, 2007).

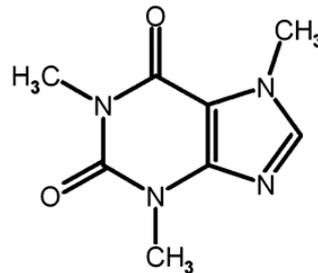
Em abril de 2004, em um encontro envolvendo o NIH (*National Institutes of Health*), o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), o SAMHSA (*Substance Abuse and Mental Health Services Administration*) e pesquisadores com reconhecida proficiência na área propuseram a sigla FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder*), que desde então, é o termo utilizado internacionalmente para nomear toda gama de efeitos e características físicas e/ou cognitivas que podem ser observados em um indivíduo cuja mãe ingeriu etanol durante a gravidez (Mukherjee RA et al., 2006; Spohr HL et al., 2007). Estima-se que a prevalência da FASD seja de 9 casos por 1000 nascimentos (May et al., 2009; Rasmussen C, 2005; Spohr HL et al., 2007), taxa esta que é duas vezes maior que a das duas alterações congênitas mais comuns (síndrome de Down e espinha bífida) combinadas (May and Gossage, 2001; Rasmussen C, 2005; Spohr HL et al., 2007). Quando as análises se restringem a crianças e adolescentes em idade escolar, estes números são ainda maiores, variando entre 2 a 5% em países em desenvolvimento (May et al., 2009; May et al., 2011; Riley et al., 1993).

### **Cafeína e o sistema nervoso central**

A cafeína é um composto químico de fórmula  $C_8H_{10}N_4O_2$  (Figura 3) classificado como alcalóide purínico ou metilxantina, designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina. Caracteriza-se por ser um pó branco, cristalino, inodoro, altamente resistente ao calor e com sabor amargo característico (Monteiro e Trugo, 2005). Ela atua como um antagonista da

adenosina, produzindo efeitos estimulatórios do sistema nervoso central. Sua ação estimulante é amplamente conhecida e estudada, porém efeitos antioxidantes também são documentados em alguns estudos, embora as conclusões sejam controversas (Ludwig *et al.*, 2012).

Figura 3 - Representação da fórmula estrutural da molécula de cafeína



Fonte: (Bonita *et al.*, 2007)

A ação farmacológica da cafeína consiste no bloqueio dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_2$  (Fredholm *et al.*, 1999). A adenosina é considerada um neuromodulador endógeno que controla a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e o ritmo circadiano (Cunha, 2001; Fredholm *et al.*, 2005). Além disso, coordena as respostas da dopamina e outros neurotransmissores em áreas do encéfalo responsáveis pela função motora e aprendizado e memória (Fredholm *et al.*, 2005). O receptor adenosinérgico do subtipo  $A_1$  é o mais abundante, principalmente na região do neocórtex, cerebelo, hipocampo e corno dorsal da medula espinhal, enquanto que os receptores do subtipo  $A_2$  são altamente expressos em neurônios pálido estriatais e no bulbo olfatório, mas também são encontrados em outras regiões do cérebro, como no hipocampo (Fredholm *et al.*, 2005). A cafeína também afeta a liberação de cálcio intracelular, interfere nos receptores GABA<sub>A</sub> e inibe a 5'-nucleotidase de fosfatase alcalina, mas isso em concentrações mais elevadas do que as requeridas para o antagonismo o sistema adenosinérgico (Lelo *et al.*, 1986; Kaplan *et al.*, 1989; Denaro *et al.*, 1990; Chou, 1992; Benowitz *et al.*, 1995).

### Exposição gestacional à cafeína

A média mundial para o consumo de cafeína é estimada entre 70 a 76 mg por dia, mas chega a 168 mg/dia nos EUA e 40 mg/dia no Brasil (Fredholm *et al.*, 1999). Na Suécia e

Finlândia, este número é bem maior, chegando a mais de 400 mg por dia (equivalente ao consumo de mais de 10 xícaras de café por dia) (Fredholm et al., 1999). Um dado importante para esse trabalho é que aproximadamente 70% das mulheres consomem cafeína diariamente durante a gestação (Frary et al., 2005). A cafeína e seus metabólitos (teobromina, teofilina e paraxantina) possuem grande solubilidade lipídica e uma baixa ligação às proteínas plasmáticas. Estas características permitem a rápida passagem pelas membranas celulares e, portanto, não existe nenhuma barreira sangue-cérebro entre adulto ou feto (Fredholm et al., 1999). Um estudo em recém-nascidos mostrou que as concentrações de cafeína no plasma e fluido cérebro-espinhal são semelhantes (Nehlig et al., 1992). Níveis elevados de cafeína foram relatados em crianças prematuras nascidas de mulheres que foram consumidoras pesadas de cafeína (Khanna e Somani, 1984). Desta forma, é possível que o consumo normal de cafeína durante a gestação, ainda que não promova danos diretos ao sistema nervoso do feto, potencialize o papel desempenhado pelo etanol na manifestação dos transtornos neurocomportamentais observados na FASD, porém não existem estudos conclusivos que possam dar suporte a esta hipótese.

A cafeína está presente na composição de diversas bebidas (refrigerantes, chás, café, energéticos e achocolatados), de alimentos derivados do cacau e de alguns medicamentos e, portanto, é a substância neuroativa mais consumida no mundo. Seu consumo é tão amplo que aproximadamente 70% das mulheres consomem cafeína diariamente durante a gestação (Frary *et al.*, 2005). De modo geral, o consumo moderado de cafeína é considerado seguro para o feto e durante a amamentação (Tanda e Goldberg, 2000; Gressens *et al.*, 2001). Alguns autores, contudo, têm sugerido que, apesar de apresentar baixa teratogenicidade, a cafeína pode exacerbar os efeitos deletérios do etanol (Streissguth *et al.*, 1980; Gressens *et al.*, 2001). Desta forma, é possível que o consumo normal de cafeína durante a gestação, ainda que não promova danos diretos ao sistema nervoso do feto, potencialize o papel desempenhado pelo etanol na manifestação dos transtornos neurocomportamentais observados na FASD. Apesar de plausível, esta hipótese ainda carece de suporte experimental para validá-la. A existência de modelos animais para o estudo das alterações neurocomportamentais decorrentes da interação entre o etanol e a cafeína abre grandes possibilidades de investigação em condições controladas (sem a influência de possíveis “contaminantes”).

Alguns estudos afirmam que o consumo moderado de cafeína é considerado seguro para o feto e durante a amamentação (Gressens et al., 2001; Tanda and Goldberg, 2000). Contudo, a cafeína, quando consumida em grandes quantidades durante a gestação, tem sido associada com baixo peso ao nascer e aumento do risco de aborto espontâneo (Fernandes et

al., 1998). Um estudo longitudinal realizado em humanos mostrou efeitos negativos no consumo da cafeína, como o aumento no risco de restrição no crescimento fetal em mães que consumiram essa substância ao longo da gravidez (Nehlig e Debry, 1994). Além disso, a exposição gestacional a cafeína tem sido associada com déficits neurocomportamentais, como alteração do desenvolvimento neuromuscular, funcionamento do reflexo e irritabilidade em recém-nascidos (Loomans et al., 2012), defeitos no tubo neural (ex: espinha bífida) (Schmidt et al., 2009) e problemas sociais durante a segunda metade da infância.

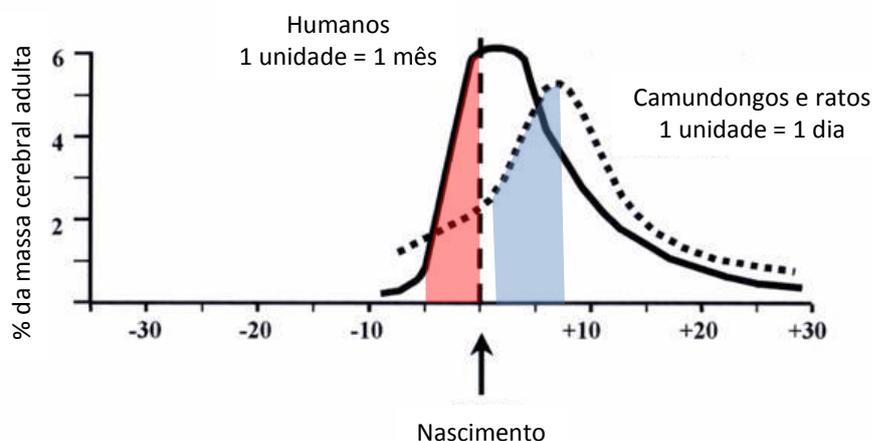
Em um estudo realizado em crianças norueguesas houve uma associação entre a exposição gestacional à cafeína e o TDAH (Bekkhuis *et al.*, 2010). Em estudos realizados nos Estados Unidos (Barr e Streissguth, 1991) e na Holanda (Loomans *et al.*, 2012) não houve associação entre o consumo de cafeína e a prevalência de TDAH. Se considerarmos o alto consumo diário de cafeína em países do norte da Europa (Fredholm *et al.*, 1999), é possível que as diferenças entre os estudos apenas reflitam uma diferença na dose de cafeína em que as crianças foram expostas durante a gestação. Contudo, outros fatores podem contribuir para os resultados contraditórios. De fato, o risco relativo para o TDAH em crianças expostas durante a gestação a mais de 10 xícaras de café por dia tornou-se estatisticamente não significativo após o ajuste das regressões para uma série de fatores de confundimento como o consumo de etanol, tabagismo, gênero, idade das mães (Linnet *et al.*, 2009). Desta forma, é possível que o consumo normal de cafeína, ainda que não seja diretamente responsável pelo TDAH, potencialize o papel desempenhado pelo etanol na manifestação deste transtorno ou até mesmo de outros transtornos neurocomportamentais. Apesar de plausível, esta hipótese ainda carece de suporte experimental para validá-la. A existência de modelos animais para o estudo das alterações neurocomportamentais decorrentes da interação entre o etanol e a cafeína abre grandes possibilidades de investigação em condições controladas (sem a influência de possíveis “contaminantes”).

### **Uso de roedores como modelo para o estudo da interação entre a exposição ao etanol e a cafeína durante o desenvolvimento**

Uma consideração importante para a utilização de roedores em pesquisas relacionadas ao estudo dos efeitos de substâncias teratogênicas, como o álcool, é que, do ponto de vista de maturação do sistema nervoso, ratos e camundongos nascem mais prematuros que os humanos (Clancy et al., 2007; Maier et al., 1999; Quinn, 2005). Um marco do desenvolvimento neural normalmente utilizado para balizar o estágio de desenvolvimento de

roedores e humanos é o período pico ou surto de crescimento cerebral (do inglês, *brain growth spurt*) (Dobbing e Sands, 1979; (Goodlet e West, 1992). Este período, caracterizado pelo crescimento exponencial do cérebro (Figura 4), se inicia em humanos no início do terceiro trimestre de gestação e tem seu pico por volta do nascimento. Em ratos e camundongos o surto de crescimento cerebral se inicia no dia do nascimento e tem seu ápice por volta do décimo dia pós-natal (Bandeira et al., 2009; Dobbing e Sands, 1979). Com base neste fato, vários autores têm considerado que, em ratos e camundongos, os primeiros 10 dias de vida pós-natal correspondem, do ponto de vista de desenvolvimento neural, ao período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Dobbing e Sands, 1979; Nunes et al., 2011). Desse modo, algumas estruturas, como o neocórtex, o hipocampo e o cerebelo, que se desenvolvem de modo marcante em humanos durante o último trimestre gestacional, em ratos e camundongos, desenvolvem-se após o nascimento (Bandeira et al., 2009; Dobbing e Sands, 1979; Hannigan e Berman, 2000).

Figura 4 - Curvas de crescimento da massa cerebral de humanos e roedores durante o desenvolvimento



Legenda: Linha contínua representa o crescimento da massa cerebral em humanos e a linha pontilhada em roedores. Os valores representam as médias das massas cerebrais corrigidas pelo peso do cérebro adulto. Notar que a fase de crescimento exponencial do surto de crescimento cerebral de humanos (área vermelha) ocorre durante a vida pré-natal e a dos roedores (área azul) ocorre no período neonatal.

Fonte: Filgueiras, C C, 2014 (estudo ainda não publicado).

Durante a fase exponencial do surto de crescimento cerebral ocorrem os picos de uma série de processos fundamentais para a formação das redes neurais como a neurogênese, a migração de populações neuronais para os seus destinos finais, a morte celular programada, o crescimento axonal e dendrítico e a sinaptogênese em diversas regiões cerebrais (Brazel et al.,

2003; Kolb e Whishaw, 1989; Olney et al., 2000). Desta forma, qualquer perturbação durante este período pode comprometer de modo significativo para a formação da futura circuitaria neural e, portanto, acarretar em prejuízos geralmente irreversíveis para a vida do indivíduo. Pode-se citar, por exemplo, o fato dos neurônios serem muito sensíveis aos efeitos apoptóticos do álcool durante esse período (Ikonomidou, 2000), onde a morte celular excessiva pode conduzir a déficits em longo prazo em processos de aprendizagem e de memória (Wozniak et al., 2004).

### **Efeitos da exposição precoce ao etanol em roedores**

De modo análogo ao observado em humanos, roedores expostos ao etanol durante a gestação apresentam retardo de crescimento (Middaugh e Boggan, 1991) e anomalias crânio-faciais (Sulik, 2005). Do ponto de vista neurocomportamental, estudos realizados em ratos e camundongos vêm demonstrando que os dez primeiros dias de vida pós-natal são um período crítico para a manifestação de transtornos como a hiperatividade locomotora (Kelly et al., 1987; Melcer et al., 1994; Nunes et al., 2011; Riley et al., 1993; Slawecki et al., 2004; Thomas et al., 2001) e os déficits de aprendizado e memória (Filgueiras et al., 2009a; Filgueiras et al., 2010).

### **Efeito da exposição precoce ao etanol na função executiva, aprendizado e memória de roedores**

A função executiva é um termo abrangente utilizado para se referir a um conjunto de operações mentais utilizadas para o controle e execução de tarefas cognitivas que incluem a memória de trabalho, o raciocínio, a inibição de respostas e comportamentos voltados para a resolução de problemas. Acredita-se que estas funções sejam dependentes de estruturas do lobo frontal (Ridderinkhof *et al.*, 2004) assim como do córtex pré-frontal, embora alguns pesquisadores argumentem que estruturas além do lobo frontal também possam estar envolvidas (Alvarez e Emory, 2006). Em seres humanos, esses comportamentos podem facilmente ser mensurados através de testes padronizados, que possuem o seu desempenho

gravemente impactados pelo uso de álcool no período pré-natal (Rasmussen, 2005). Crianças com FASD tem dificuldades em inibir respostas no teste de “Stroop” (Connor *et al.*, 2000), uma tarefa em que um indivíduo deve inibir a tendência natural de ler palavras, sendo necessário indicar a cor da fonte. Adicionalmente, esses indivíduos têm dificuldade em suprimir movimentos sacádicos em tarefas visuais enquanto aguardam o sinal de início apropriado (Paolozza *et al.*, 2013) e exibem memória de trabalho pobre quando solicitados a recordar os dígitos de trás pra frente (Aragon *et al.*, 2008). No Teste Wisconsin de classificação de carta, onde o sujeito deve detectar, usar e alterar cartões ou estratégias de classificação os indivíduos com FASD cometem mais erros relacionados à mudança de estratégias de classificação (Vaurio *et al.*, 2008). Em roedores, testes de função executiva são complexos e uma única tarefa requer o uso de resposta inibitória, memória de trabalho e definir mudanças, além de outros fatores. As tarefas de inibição de resposta exigem que os sujeitos inibam as respostas predispostas naturalmente pelo organismo em ambientes particulares. Por exemplo, a esquiva passiva, é um teste comumente utilizado em roedores para mostrar resposta inibitória. Nesses testes, os roedores são colocados em uma caixa com uma área “segura” para ele, adjacente a um piso de grade que irá fornecer um choque se o animal pisar na grade em uma tentativa/treino. O animal deve aprender a inibir a tendência natural de explorar novos ambientes e permanecer no lado “seguro” da câmara de teste durante todo o treino. Ratos expostos ao etanol no período pré-natal (dieta líquida GD6-16) mostraram deficiência nos testes de esquiva passiva, tanto em PN17 quanto PN41 (Riley *et al.*, 1979). Em outro estudo maior, proles expostas ao etanol (dieta líquida GD5-20) novamente mostraram déficits na esquiva passiva em PN17 e PN48, mas não em PN114, e demorou mais tempo para alterar espontaneamente sua estratégia exploratória em um labirinto em “T”, onde o animal ficaria confinado após visitar um determinado braço quando testado no PN16 e PN63, mas não em PN112 (Abel, 1982).

O teste de esquiva passiva inibitória (*Step Down test*) é útil para avaliar tanto a memória de curto prazo, aquela que dura de 1h à 6h, assim como a memória de longo prazo, que dura dias, meses ou até mesmo anos. Isso é possível porque a diferença entre essas memórias não reside no seu conteúdo cognitivo, mas sim nos mecanismos posteriores a formação delas. Em outras palavras, significa dizer que a informação passada pelos estímulos, que nesse caso são aversivos, responsáveis pela formação de ambas as memórias chega através das mesmas vias sensoriais, e a resposta ou as respostas correspondentes são emitidas pelas mesmas vias motoras ou eferoras (Izquierdo, 2011).

## Efeito da exposição precoce ao etanol na ansiedade de roedores

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um aparato com o formato de uma cruz, com dois braços abertos e dois braços fechados com paredes. O LCE um teste confiável e validado usado para mensurar ansiedade/medo em roedores, como indicado por respostas comportamentais, fisiológicas e farmacológicas (Pellow *et al.*, 1985; Pellow e File, 1986; Lister, 1987). Animais confinados aos braços abertos mostram níveis elevados de corticosteroides (Pellow *et al.*, 1985), e a mensuração do número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nesses braços abertos são irreversivelmente relatados como ansiedade (Cruz *et al.*, 1994), já que ratos tem um medo inato de espaços abertos. Atividade locomotora também pode ser quantificada pela distância total percorrida e o número de entradas nos braços. Esta última medida é independente da ansiedade, já que tratamentos sedativos reduzem o total de entradas nos braços sem mudança no tempo gasto nos braços abertos (Pellow e File, 1986).

Estudos com modelos animais de FASD tem mostrado que a exposição pré-natal ao etanol pode produzir efeitos na ansiedade como um comportamento na prole. Dursun *et al.* (2006) encontrou que a prole de ratos expostos à altas doses de etanol (6 g/Kg via gavagem intragástrica entre os dias gestacionais 7 e 20; concentração de etanol no sangue (BEC) 0,35 g/dl 3horas após a gavagem) gastaram menos tempo nos braços abertos no labirinto em cruz elevado, um indicador do aumento do comportamento ansioso. Utilizando o teste de campo aberto, Zhou *et al.* (2010) mostrou que exposição pré-natal à altas doses de etanol (6 g/Kg via gavagem intragástrica entre os dias gestacionais 7 e 20; concentração de etanol no sangue (BEC) 0,35 g/dl 3horas após a gavagem no dia pós-natal 20 = 0,35 g/dl) aumentou a ansiedade no rato adulto da prole. A exposição durante o desenvolvimento de ratos ou camundongos a baixas doses de etanol tem mostrado um decréscimo no comportamento ansioso [0,5 e 4 g/Kg de etanol via gavagem gástrica desde o parto até o desmame; BEC não determinado; (Carneiro *et al.*, 2005)], ou sem mudanças significativas em bebedor voluntário de água com sacarina contendo 5% de etanol durante duas semanas pré-gravidez e durante a gestação; BEC = 0,08 g/dl; (Savage *et al.*, 2010; Staples *et al.*, 2013). Bebendo no paradigma claro/escuro, usando 20% v/v de etanol na água durante toda a gestação [BEC = 1,125 – 0,175 g/dl; (Boehm *et al.*, 2088)], ou com dieta líquida contendo 6% v/v de etanol durante a gestação [BEC = 0,03 g/dl; (Probyn *et al.*, 2012; Cullen *et al.*, 2013)], houveram efeitos complexos que podem depender do sexo do animal e/ou do seu estado de ativação

comportamental antes do teste (Osborn *et al.*, 1998; Wilcoxon *et al.*, 2005; Gabriel *et al.*, 2006a)]. Coletivamente, esses achados indicam que a exposição ao etanol durante o primeiro e segundo trimestre de gravidez pode ter efeitos no comportamento ansioso de roedores dependendo da dose e do tempo de administração do etanol.

Ethen *et al.* (2009) relatou que algumas mulheres grávidas se abstêm durante os dois primeiros trimestres da gravidez e começam a beber durante o terceiro trimestre, quando se pode erroneamente presumir que é seguro beber já que os principais processos de desenvolvimento estão completos. Entretanto, circuitos neuronais passam por significativa diferenciação e refinamento durante esse período e isso pode torna-los particularmente suscetíveis às ações do etanol. Para modelar exposição durante esse período, o etanol tem sido administrado durante as primeiras 1-2 semanas de vida pós-natal em ratos, quando o surto de crescimento cerebral acontece nesses animais (Cudd, 2005). Um estudo inicial com ratos expostos ao etanol entre os dias pós-natais P4 e P12 usando procedimento de criação artificial (BEC = não determinado) encontrou evidência consistente com o aumento da ansiedade usando o teste do campo aberto (Kaneko *et al.*, 1996). Em contraste, estudos mais recentes falharam em detectar algum efeito significativo do etanol. Roskam e Koch (2009) viram que injetar ratos com altas doses de etanol em P7 [duas doses de 2,5 g/Kg i.p. com 2 horas de intervalo entre elas; BEC = não determinado, porém é esperado que essa metodologia produza altos níveis, próximo de 0,5 g/dl; (Ikonomidou *et al.*, 2000)] não alterou significativamente a performance no labirinto em cruz elevado durante a fase adulta. Diaz *et al.* (2014) encontrou que exposição a doses moderadas de etanol em câmaras de vapor entre P2 e P12 (BEC = 0,1 d/dl) não afetou significativamente o comportamento de ansiedade durante a adolescência em ratos.

### **Efeito da exposição precoce ao etanol na lateralidade**

Existe uma gama de estudos demonstrando que roedores apresentam assimetrias cerebrais (Lent e Schmidt, 1993; Schwarting e Huston, 1996). Entretanto, é escasso o número de estudos investigando os efeitos da lateralização cerebral de roedores expostos precocemente ao etanol, e em todos os casos, os filhotes foram expostos durante o período pré-natal (Zimmerberg e Riley, 1986; Zimmerberg e Reuter, 1989; Moreland *et al.*, 2002), o que é considerado um período equivalente ao primeiro e segundo trimestre de gestação

humana (Maier *et al.*, 1999; Maier e West, 2001a; b; Livy *et al.*, 2003). Além disso, muitos estudos avaliaram os efeitos da exposição pré-natal ao etanol na prole somente durante um curto período de tempo após o nascimento.

O comportamento de rotação é um comportamento lateralizado que tem sido amplamente utilizado como ferramenta experimental para estudos de assimetria cerebral tanto em humanos (Bracha *et al.*, 1987; Mohr *et al.*, 2004) quanto em camundongos (Schwartzing e Huston, 1996; Krahe *et al.*, 2001; Filgueiras e Manhães, 2004; 2005; Filgueiras *et al.*, 2006; Manhães *et al.*, 2007). Um método usado para avaliar o comportamento rotacional é o teste de nado forçado, um paradigma simples em que os animais são forçados a nadar por alguns minutos em um recipiente cilíndrico (Schmidt *et al.*, 1965; Filgueiras e Manhães, 2004; 2005; Filgueiras *et al.*, 2006; Manhães *et al.*, 2007). Apesar da simplicidade, o teste de nado livre tem uma característica única quando comparado a outros testes circulatórios: é registrado em um ambiente mais estressante, onde os animais passam a maior parte do tempo nadando perto da parede do recipiente, tentando escapar de uma situação de teste assustadora. Essa situação de teste estressante pode adicionar uma interessante característica ao teste de nado livre para a análise comportamental nos efeitos da exposição precoce ao etanol. Tem sido bem demonstrado que déficits comportamentais que melhoram com a idade em animais expostos ao etanol no período pré-natal podem ressurgir sob condições desafiadoras ou estressantes (Hannigan *et al.*, 1987; Gabriel *et al.*, 2006b)

### **Mecanismos envolvidos na teratogenicidade do etanol**

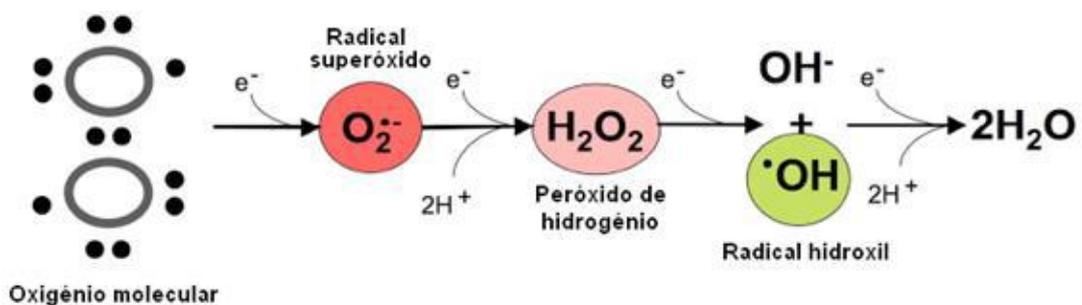
Estudos em roedores têm revelado que o etanol é capaz de afetar muitos eventos do desenvolvimento neural, incluindo, a proliferação celular, adesão entre células, morte celular programada, migração, crescimento axonal e sinaptogênese (Goodlett *et al.*, 2005). Esta gama de efeitos pode se manifestar através de múltiplos mecanismos moleculares, a saber: 1) alterações na regulação intrínseca da expressão gênica pela alteração na produção de fatores de transcrição; 2) interferência com funções celulares ou com a sinalização molecular que controla a sobrevivência e morte celular; e 3) distúrbios na sinaptogênese decorrentes de perda de suporte trófico, expressão de receptores e proteínas estruturais ou diminuição dos alvos sinápticos. Vale mencionar que todas estas ações, em última análise, contribuem para o comprometimento da atividade da célula e podem culminar com a morte das populações

neurais suscetíveis. De fato, uma das consequências mais marcantes da exposição do sistema nervoso em desenvolvimento ao etanol é o aumento da morte de células neurais (Olney, 2004).

Alternativamente, alguns autores vêm sugerindo que alguns dos problemas neurológicos decorrentes da exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral se devem a uma redução da plasticidade neural, que é a capacidade do sistema nervoso modificar sua estrutura e função para se adaptar a novas condições (Hannigan et al., 2007; Medina et al., 2011; Medina et al., 2006). Em roedores, por exemplo, a exposição precoce a doses moderadas de etanol promove alterações significativas na distribuição de espinhas dendríticas (Gonzalez-Burgos et al., 2006) e na taxa de neurogênese adulta (Choi et al., 2005) no hipocampo. Como a redução da plasticidade neural compromete de modo marcante o processamento e armazenamento de novas informações pelo cérebro, é possível especular que esta ação do etanol seja a principal causa dos defeitos de aprendizado e memória observados na FASD.

De particular interesse para este estudo um número crescente de estudos vem mostrando que a exposição ao etanol durante o desenvolvimento aumenta os níveis de estresse oxidativo (Cohen-Kerem e Koren, 2003; Brocardo *et al.*, 2011; Ikonomidou e Kaindl, 2011; Collins e Neafsey, 2012; Hernández *et al.*, 2016). O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio na formação de radicais livres e a capacidade desse organismo vivo em eliminá-lo (Mlp e Lmg, 1999; Albs *et al.*, 2006; Barbosa, 2010). São formadas então as espécies reativas de oxigênio (EROs) através do processo metabólico natural de respiração celular (Bieben *et al.*, 2012). (Figura 5).

Figura 5 – Esquema de umas das formas de como são formadas as EROs



Legenda: Redução univalente do oxigênio a água nas mitocôndrias. Várias espécies reativas são formadas.  
Fonte: Pereira, 2009.

Em concentrações baixas à moderadas, as EROs possuem importantes funções nos processos fisiológicos celulares, porém, quando em concentrações altas, são capazes de produzir modificações adversas nos componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA que podem comprometer o desenvolvimento do sistema nervoso (Wang *et al.*, 1996; Valko *et al.*, 2006). As EROs podem ser divididas em dois grupos: radicais livres e não radicais. Moléculas contendo um ou mais elétrons não pareados e, portanto, dando reatividade à molécula são chamados de radicais livres. Quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados, formas não radicais são criadas. As três principais EROs com importância fisiológicas são ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Bierben *et al.*, 2012). As EROs estão resumidas na Tabela 1.

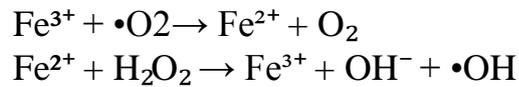
Tabela 1 - Principais Oxidantes Endógenos

Oxidante	Fórmula	Equação de Reação
Ânion Superóxido	$O_2^- \cdot$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADPH^+ + H^+$ $2O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de Hidrogênio	$H_2O_2$	$Hipoxantina + H_2O + O_2 \leftrightarrow xantina + H_2O_2$ $Xantina + H_2O + O_2 \leftrightarrow \text{ácido úrico} + H_2O_2$
Radical Hidroxila	$\bullet OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$
Ácido Hipocloroso	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radical Peroxil	$ROO\bullet$	$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$
Radical Hidriperoxil	$HOO\bullet$	$O_2 + H_2O \leftrightarrow HOO + OH^-$

Fonte: Adaptado de Bierben *et al.*, 2012.

O ânion superóxido é formado pela adição de um elétron a molécula de oxigênio (Miller *et al.*, 1990). Esse processo é mediado pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase [NAD(P)H] oxidase ou xantina oxidase ou pelo sistema de transporte de elétron mitocondrial. O principal local para a produção de ânion superóxido é a mitocôndria, a maquinaria da célula para produzir trifosfato de adenosina. O superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio pela ação das superóxido dismutases (SODs). O peróxido de hidrogênio difunde-se facilmente através da membrana plasmática. Em uma sucessão de reações chamadas Reações Haber-Weiss e Fenton (Figura 6), o  $H_2O_2$  pode quebrar o ânion  $OH^-$  na presença de metais de transmissão como  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  (Fenton, 1984).

Figura 6 - Reações Haber-Weiss e Fenton



Legenda: Equação de Haber-Weiss Fenton

Fonte: Bieben, 2012.

O  $\text{O}_2^-$  por ele mesmo consegue reagir com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e gerar  $\text{OH}^-$  (26,27) e pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (Green *et al.*, 2004; Schneider e Oliveira, 2004). O radical hidroxil é o mais reativo das EROs podendo danificar proteínas, lipídios, carboidratos e DNA. Ele também pode iniciar a peroxidação lipídica tomando um elétron a partir de ácidos graxos polinsaturados, sendo considerado o principal iniciador do processo (Welch *et al.*, 2002).

Outros radicais livres derivados do oxigênio são os radicais hidroxil ( $\text{ROO}\bullet$ ). A forma mais simples desses radicais é o radical hidroperoxila ( $\text{HOO}\bullet$ ) e desempenha um papel importante na peroxidação dos ácidos graxos. Os hidroperóxidos lipídicos são muito instáveis e facilmente se decompõe em produtos secundários, tais como aldeídos (ex: 4-hidroxi-2,3-nonenal) e malondialdeídos (MDAs). Os isoprostanos são outro grupo de produtos de peroxidação lipídica que são gerados através da peroxidação do ácido araquidônico e também foram encontrados elevados nos condensados plasmáticos e respiratórios de pessoas asmáticas (Montuschi *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2000). A peroxidação lipídica altera a integridade das membranas celulares e leva ao rearranjo da estrutura da membrana.

### **Efeitos da exposição precoce a cafeína em roedores**

Em relação à cafeína, estudos em roedores confirmam seu baixo potencial teratogênico em doses baixas (Nehlig e Debry, 1994). Contudo, quando administrada em doses altas, a cafeína tem sido associada com a redução do crescimento (Nehlig e Debry, 1994) e da massa cerebral dos fetos (Tanaka *et al.*, 1987) e uma série de distúrbios neurocomportamentais. Em ratos, a exposição a doses moderadas de cafeína durante toda a gestação interfere negativamente com o reconhecimento de objetos e o comportamento no labirinto radial em machos e fêmeas (Soellner *et al.*, 2009). Exposição pré-natal a cafeína induz mudanças

bioquímicas, como as modificações nos níveis cerebrais de catecolaminas, tirosina, triptofano, serotonina e nucleotídeos cíclicos nos cérebros de 1 a 35 dias em ratos (Nehlig et al., 1992). A administração intraperitoneal de cafeína (50 mg/kg, 3 vezes ao dia) em filhotes de ratos de 7 dias de idade produz morte neuronal no córtex parietal, córtex temporal, núcleo estriado, células granulares do giro denteado, tálamo e hipotálamo (Kang et al., 2002).

Estudos em roedores têm mostrado que, embora o efeito primário da cafeína seja o bloqueio dos receptores de adenosina A1 e A2A, existem efeitos secundários em diversas classes de neurotransmissores, como a noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA, que influenciam diferentes funções fisiológicas (Daly et al., 1981).

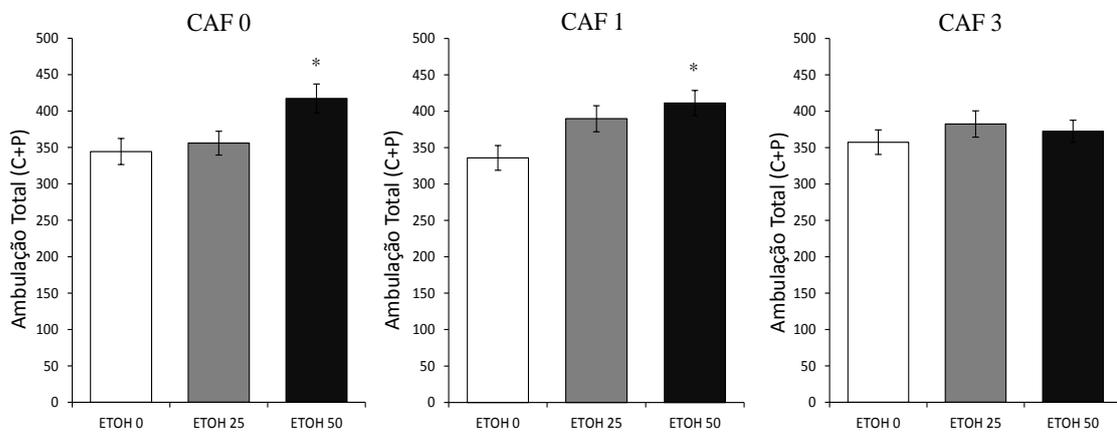
### **Efeitos da exposição combinada à cafeína e ao etanol durante o desenvolvimento**

Apesar das evidências epidemiológicas do uso combinado de etanol e cafeína (Benedum et al., 2013; Crozier et al., 2009), a interação estas substâncias durante o desenvolvimento têm recebido pouca atenção em estudos experimentais. Este fato é particularmente importante visto que alguns estudos apontam que cafeína é capaz de ampliar alguns aspectos importantes da ação de outras substâncias neurotóxicas, como o etanol. Por exemplo, a exposição pré-natal desde o sexto até o vigésimo dia gestacional ao álcool (15g/kg/dia) ou a cafeína (84mg/kg/dia) reduzem o ganho de peso das mães durante a gravidez e o peso ao nascer das ninhadas (Hannigan, 2000). A exposição combinada ao etanol e a cafeína produz um efeito aditivo na redução do peso no nascimento, no aumento da mortalidade pré- e pós-natal (Henderson and Schenker, 1984; Ross and Persaud, 1989) e na ocorrência de defeitos no fechamento do tubo neural (Ross and Persaud, 1989, Ross and Persaud, 1986).

De particular interesse para este estudo, a administração aguda tanto de etanol como de cafeína durante o período de sinaptogênese causa extensa morte neuronal em diversas regiões cerebrais do cérebro de roedores (Kang et al., 2002; Ikonomidou, 2009). Em cultura, a administração concomitante destas duas substâncias causa uma perda celular maior do que a simples soma das perdas provocadas por cada uma isoladamente (Ikonomidou, 2009). Considerando que os transtornos neurocomportamentais observados na FASD têm sido fortemente associados com a redução no número de neurônios em estruturas como o neocórtex e hipocampo (Medina, 2011), é possível que a exposição combinada ao etanol e à

cafeína durante o desenvolvimento tenha um papel mais importante na manifestação dos principais distúrbios neurocomportamentais observados na FASD do que o desempenhado pelo consumo apenas de etanol. Em contraste com esta ideia, em um estudo recentemente concluído (Filgueiras et al., 2015), demonstramos que a exposição à altas doses de cafeína (0,3 g/L) do primeiro dia gestacional até o vigésimo primeiro dia pós-natal não apresentavam hiperatividade locomotora induzida pela administração de etanol durante o período de surto de crescimento cerebral (Figura 7).

Figura 7 - Efeitos do etanol na atividade locomotora



Legenda. Médias ( $\pm$  Erro padrão da média) da ambulação total dos animais que receberam uma injeção de etanol com 2,5g/kg de etanol (ETOH25), 5g/kg de etanol (ETOH50) ou salina (ETOH0) do segundo ao oitavo dia pós-natal distribuídos em função da exposição à cafeína. Do início da gestação até o vigésimo primeiro dia pós-natal os animais receberam água potável (CAF0) ou foram expostos a soluções de cafeína de 0,1g/L (CAF1) ou 0,3 g/L (CAF3). Notar que a exposição ao etanol não afetou a atividade locomotora dos animais do grupo CAF3. FLSD: \*  $P < 0.05$  maior que os demais grupos.

Fonte: Filgueiras et al., 2015(Trabalho ainda não publicado).

Considerando que alguns dos transtornos neurocomportamentais observados na FASD têm sido atribuídos a um aumento dos níveis de estresse oxidativo causados pelo etanol e que a cafeína apresenta propriedades antioxidantes (Herman e Herman, 2013), é possível que uma redução do estresse oxidativo tenha contribuído para a ausência de hiperatividade nos animais expostos a solução de cafeína mais concentrada. Contudo, esta hipótese ainda que plausível, carece de suporte experimental capaz de validá-la. Além disso, o fato de a cafeína em uma dose mais elevada ter mitigado a hiperatividade locomotora induzida pela administração de etanol em camundongos neonatos, abre uma margem de investigação sobre as suas propriedades antioxidantes e possíveis efeitos protetores sobre distúrbios neurocomportamentais decorrentes da exposição a agentes neurotóxicos durante o

desenvolvimento. Vale mencionar que a administração de cafeína é o procedimento padrão para a prevenção da apneia e morte súbita em bebês prematuros (Maitre et al., 2014). De modo interessante, prematuros que receberam o tratamento com cafeína após o nascimento apresentaram, quando comparados à prematuros não tratados com cafeína, melhor desempenho em medidas que refletem o desenvolvimento do processamento sensorial (Maitre et al., 2014) e cognitivo (Gray et al. , 2011). Desta forma, torna-se essencial investigar se os efeitos da cafeína para a manifestação da hiperatividade locomotora causada pelo etanol se estende a outros transtornos neurocomportamentais observados na FASD.

## 1 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo principal testar a hipótese que a exposição à cafeína minimiza as alterações neurocomportamentais induzidas pela exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral. Para tanto, foram realizados dois estudos.

No primeiro estudo objetivamos avaliar o comportamento tipo ansioso, o aprendizado e memória e a lateralidade rotacional no teste de nado forçado de camundongos adolescentes que foram expostos à cafeína e/ou etanol durante o desenvolvimento. A cafeína foi administrada do primeiro dia gestacional até o 21º dia pós-natal (dia do desmame). O etanol foi administrado durante o período do surto de crescimento cerebral do 2º ao 8º dia pós-natal. Os comportamentos foram avaliados a partir do 30º dia de vida pós-natal (início da adolescência).

No segundo estudo objetivamos avaliar biomarcadores do estresse oxidativo no córtex cerebral de camundongos neonatos e adolescentes que foram expostos à cafeína e/ou etanol durante o desenvolvimento. Os períodos de exposição a cafeína e etanol foram idênticos aos do estudo 1. O estresse oxidativo foi avaliado no 9º e no 30º dia de vida pós-natal.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/005/2014). Todos os experimentos estão de acordo com a declaração de Helsinque e com o Guia de Cuidados de Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional da Saúde.

### 2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos Suíços cujas matrizes foram adquiridas do Instituto Vital Brazil (Niterói, Rj) e na Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ). Os animais foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ em um ciclo de luminosidade de 12 horas (início do período escuro = 13:00 h) a uma temperatura controlada em torno de 22 °C. Os animais tiveram livre acesso à comida e água.

O desmame foi realizado em PN21 (PN1 = Dia do nascimento). Neste dia, os animais da mesma ninhada foram separados por sexo e divididos em grupos de 2 a 5 camundongos por caixa até o final do período de testes.

### 2.2 Exposição à Cafeína

Os animais foram expostos à cafeína (cafeína anidra 1,3,7 trimetilxantina, Proquimios, BR) desde o primeiro dia gestacional (G1) até o vigésimo primeiro dia pós-natal (PN21). Para tanto, garrafas contendo soluções de cafeína de 0,1 g/L (Grupo CAF1; 11 ninhadas) ou 0,3 g/L (Grupo CAF3; 13 ninhadas) foram utilizadas como única fonte de água desde o primeiro dia de acasalamento até o vigésimo primeiro dia pós-parto. O grupo controle (CAF0; 7 ninhadas) teve acesso a água potável durante todo o experimento. As concentrações foram escolhidas por simularem exposições equivalentes ao consumo diário de 1-2 xícaras de café (grupo CAF1) e de 3-4 xícaras de café por dia (grupo CAF3) (Bjorklund et al., 2008;

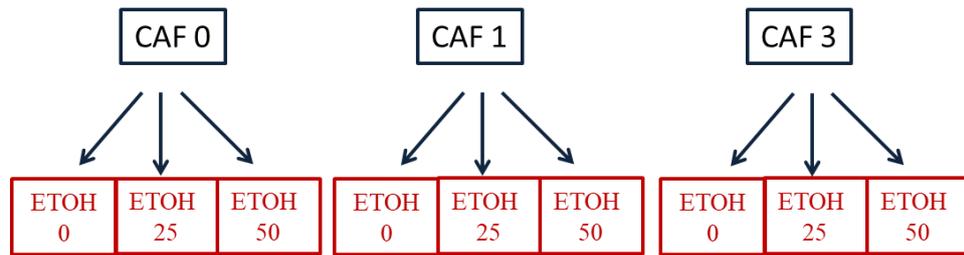
Nakamoto et al., 1991). Para uma estimativa da quantidade de cafeína consumida, a massa corporal dos animais e o volume de líquido nas garrafas foram medidos a cada dois dias (quando se deu a renovação do conteúdo das garrafas) durante o período de acasalamento.

### **2.3 Exposição ao Etanol**

Em PN2, os animais de cada ninhada foram semi-randomicamente divididos em três grupos e marcados de forma diferente com uma pequena tatuagem (Microtattoo system, Harvard Apparatus Inc. EUA) com o intuito de identificá-los ao longo do estudo. Após essa marcação, em dias alternados de PN2 a PN8, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de etanol em duas concentrações diferentes: 0,25  $\mu\text{l/g}$  (ETOH25) ou 0,5  $\mu\text{l/g}$  (ETOH50); ou solução salina NaCl a 0,9% (ETOH 0), formando ao final, 9 grupos experimentais (Figura 8). As doses de 0,25 e 0,5  $\mu\text{l/g}$  de etanol foram escolhidas com base em estudos realizados por nosso grupo mostrando que os filhotes atingem picos sanguíneos de etanol que estão dentro da faixa que um feto humano pode ser exposto, após a ingestão materna de uma dose de álcool de moderada à alta (Filgueiras et al., 2009b; Nunes et al., 2011). Além disso, 90% dos animais injetados com etanol de acordo com este protocolo sobrevivem até a idade adulta (Filgueiras et al., 2009b).

Com o objetivo de minimizar o risco de lesões nos órgãos internos, foi utilizada uma agulha com pequeno calibre (28G) que era cuidadosamente inserida na região abdominal até a cavidade peritoneal. O tratamento em dias alternados foi escolhido por ser o padrão de exposição rotineiramente utilizado em estudos que avaliam, em modelos animais, os efeitos comportamentais decorrentes da exposição ao etanol durante o período neonatal (Filgueiras et al., 2009b; Filgueiras et al., 2010; Medina e Krahe, 2008).

Figura 8 - Grupos experimentais



## 2.4 Taxa de mortalidade

A taxa de mortalidade decorrente dos diferentes tratamentos foi calculada separadamente para cada ninhada pela razão entre o número de animais mortos até o dia de teste e o total de animais injetados em PN2.

## 2.5 Análise Comportamental

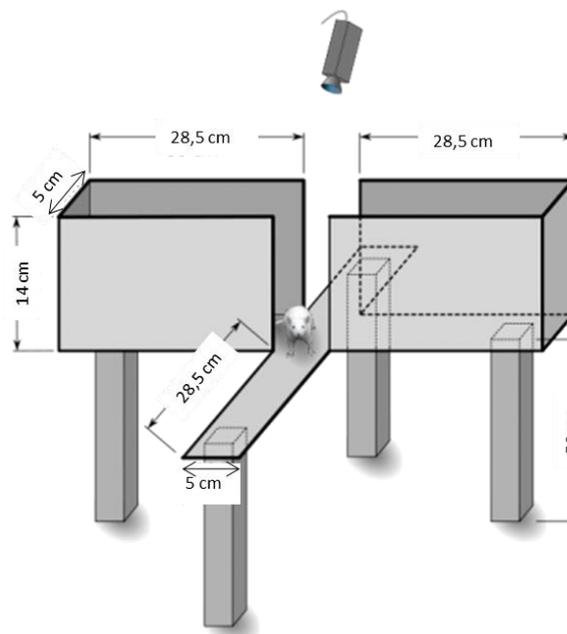
### 2.5.1 Teste Labirinto em Cruz Elevado

O comportamento associado à ansiedade foi investigado usando o teste do labirinto em cruz elevado, cujo horário de realização foi entre 8:00 e 9:30h. Todos os animais foram colocados para habituação por 15 minutos na sala teste antes da realização do teste comportamental. O labirinto em cruz elevado tem a forma de um sinal de adição das operações matemáticas que consiste em dois braços “abertos” (sem paredes, 5 x 28,5 cm) e dois braços “fechados” (5 x 28,5 x 14 cm), arranjados perpendicularmente a uma altura de 50 centímetros do chão (FIGURA 9).

O teste começa com o animal sendo colocado no do equipamento com o focinho direcionado para o braço aberto. Cada teste teve a duração de 5 minutos na sala com o som atenuado. No final da sessão, o chão e as paredes do equipamento foram limpos antes do próximo animal a ser testado. Todos os testes foram gravados para posterior análise. Durante os testes, a sala foi iluminada com luz branca indireta.

A porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (% Tempo BA: o tempo gasto nos braços abertos dividido pelo tempo gasto nos braços abertos + fechados) e a porcentagem de entradas nos braços abertos (% Entradas BA: o número de entradas em braços abertos dividido por número de entradas em braços abertos + fechados) foram usados como medidas de ansiedade. Uma entrada era contada quando o animal cruzava com as quatro patas em um braço. O aumento da % do tempo BA e / ou % de Entradas BA corresponde a um comportamento semelhante à redução da ansiedade (Rodgers e Dalvi, 1997).

Figura 9 – Esquema do Labirinto em Cruz Elevado

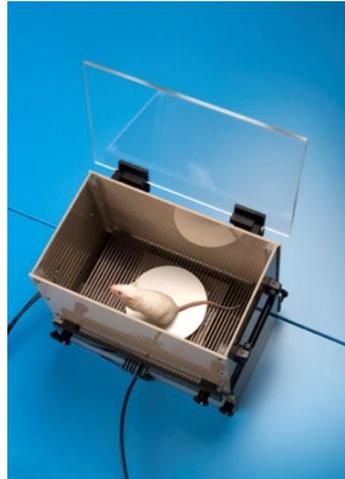


Fonte: adaptado de <http://encenasaudemental.net/comportamento/insight/modelo-animal-para-estudo-da-ansiedade/> (visitado em 10/05/2018)

### 2.5.2 Teste da esquiva inibitória (*Step-down Passive Avoidance*)

Este teste foi realizado em uma caixa (25cm x 25cm) com uma plataforma circular com diâmetro de 6,5cm e altura de 2cm, posicionada centralmente sobre uma grade metálica (espaçamento de 1 cm entre as barras de 2 mm de diâmetro) (Figura 10). Todos os animais foram submetidos a duas sessões de até dois minutos de duração realizadas entre 8:00 e 11:00 horas (período claro).

Figura 10 – Step-Down



Fonte: <http://www.cebiolog.com.br/comportamento--condicionamento--recompensa.html>. (visitado em 16/09/2018)

Em PN30 foi realizada a primeira sessão. Para tanto, os animais foram individualmente colocados sobre a plataforma e, imediatamente após colocarem as quatro patas na grade metálica, recebiam um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na segunda sessão, os animais foram recolocados na plataforma 3h ou 24h após a primeira sessão. Na segunda sessão os animais não receberam o choque após descerem da plataforma. O tempo que os animais levaram para colocar as quatro patas na grade, denominado latência de descida, foi o parâmetro utilizado para avaliar o aprendizado e memória neste teste. Além disso, utilizamos dois índices de aprendizado que foram calculados com base nas diferenças entre o tempo de latência na primeira (L1) e na segunda (L2) ou terceira (L3) sessões: L2-L1 e L3-L1.

### 2.5.3 Teste do Nado Forçado

Os testes de nado forçado foram realizados em um recipiente cilíndrico parcialmente repleto com água a uma temperatura em torno de 25°C (diâmetro: 21 cm; altura do recipiente: 23 cm; altura da coluna de água: 16 cm). Para realização do teste, os animais foram colocados no recipiente para o nado livre durante 5 minutos (Figura 11). Foram controlados: o posicionamento do recipiente, a temperatura da sala de teste e o horário de início dos testes. Os testes foram gravados por uma câmera de vídeo posicionada a 1 m acima do recipiente.

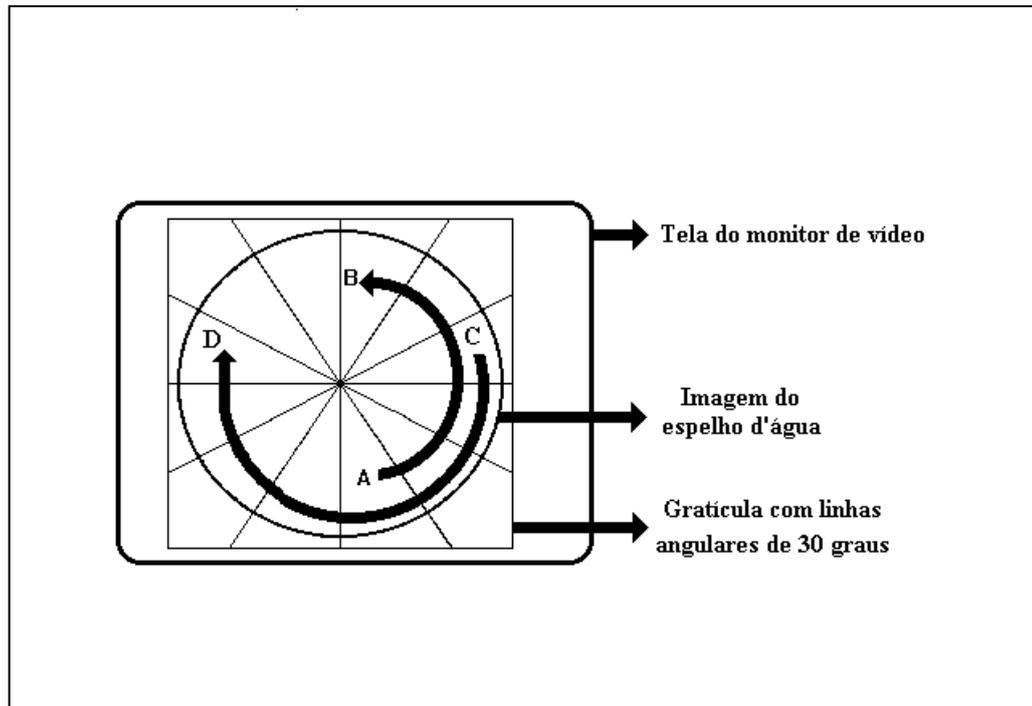
Figura 11 - Esquema do aparato utilizado para o teste de nado forçado



Fonte: Adaptado de <http://loucoengano.blogspot.com/p/teste-do-nado-forcado.html>. Visitado em 16/09/2018.

As contagens foram feitas a partir do material gravado com auxílio de uma gráticula que era sobreposta a tela do monitor de vídeo. Como indicado na Figura 12, um deslocamento, tanto para a esquerda (natação no sentido anti-horário) como para a direita (natação no sentido horário), era definido utilizando-se uma unidade de  $30^\circ$ . Para cada deslocamento eram marcados os pontos de início e de interrupção do movimento, tomando-se como referência o focinho do animal. Uma volta completa ( $360^\circ$ ) era constituída por 12 deslocamentos consecutivos  $30^\circ$  na mesma direção. Para cada animal, o registro de sucessivos deslocamentos de  $30^\circ$  em uma direção era interrompido quando o animal apresentava uma mudança de direção.

Figura 12 - Esquema utilizado para a contagem dos deslocamentos angulares



Legenda: De A para B são cruzadas quatro fatias em sentido anti-horário, o que equivale a quatro deslocamentos angulares de 30° para a esquerda. De C para D estão esquematizados seis deslocamentos de 30° para a direita (seis fatias em sentido horário).

A maioria dos animais realizou deslocamentos em torno do centro do recipiente de teste (Filgueiras e Manhães, 2004; Filgueiras e Manhães, 2005; Manhães et al., 2007). Nos casos cujo deslocamento não era feito ao redor do centro do recipiente, eram marcados os pontos de partida e do fim do movimento e foi estimado o número de deslocamentos com o auxílio da graticula.

A atividade natatória foi avaliada pelo o número total de deslocamentos (NET) que corresponde ao somatório do número de deslocamentos para a esquerda e para a direita. A lateralidade do comportamento rotacional foi estudada utilizando-se índices de direção, que indicam se o animal se desloca preferencialmente para direita ou para esquerda, e de magnitude, que indicam a grandeza das diferenças entre as rotações para o lado esquerdo e o para o lado direito. Para avaliar a magnitude da lateralidade rotacional foi utilizado o percentual de deslocamento para o lado preferido (%LP) que foi determinado pela fórmula:  $\%LP = (LP / NET) \times 100$ . Para avaliar o sentido preferencial de rotação foi utilizado o percentual de deslocamento para a direita (%R) que foi determinado pela fórmula:  $\%R = (R / NET) \times 100$  onde R corresponde ao número de deslocamentos para a direita. O %R foi utilizado como indicador do sentido preferencial de deslocamento. Desta forma, os animais

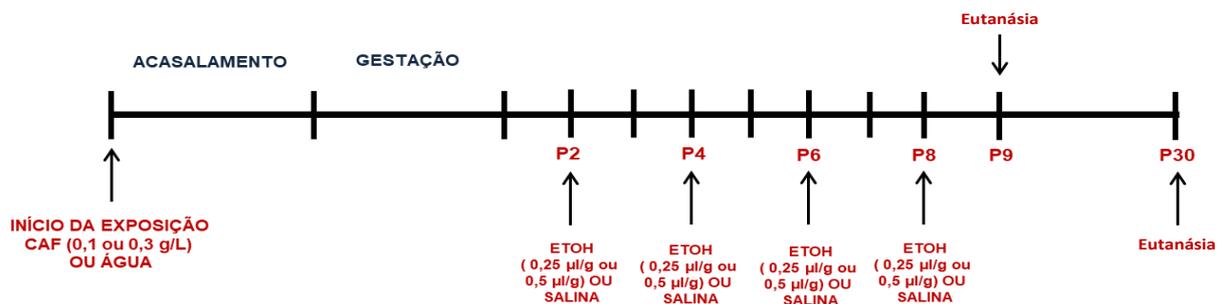
eram classificados como levógiros (sentido preferencial de natação para a esquerda), quando o valor do %R era menor que 30, e classificados como destrógiros (sentido preferencial de natação para a direita), quando o valor do %R era maior que 70.

## 2.6 Análises bioquímicas do estresse oxidativo

Para avaliar os níveis de estresse oxidativo nos tecidos do córtex, um grupo de 19 ninhadas foi exposto exclusivamente para essa etapa do estudo. A exposição à cafeína e ao etanol foi realizada da mesma forma que os grupos citados anteriormente para a fase comportamental. Estas análises foram realizadas em duas idades distintas dentro da mesma ninhada; uma parte dos animais foi avaliada em P9, 24 horas após a última injeção e o restante foi avaliada em P30, idade em que os testes comportamentais aconteciam (Figura 13).

Os animais foram mortos por deslocamento cervical e, logo em seguida, tiveram os cérebros dissecados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e foram posteriormente armazenados em freezer – 80 °C até o momento das análises.

Figura 13 - Esquema do tratamento adotado no estudo do estresse oxidativo



Legenda: A figura mostra o desenho experimental do tratamento até o dia de coletar o córtex dos animais.

### 2.6.1 Homogeneizado do córtex

Para as análises bioquímicas descritas a seguir, foram necessárias duas diferentes formas de homogeneizados do córtex. A primeira a ser descrita foi utilizada para o ensaio do DPPH e TBARS.

Foram separadas amostras de córtex de aproximadamente 60 mg e foram adicionados 300 µL de tampão KPE (pH 7,4) e feito a homogeneização em Turrex (VetroScientifica). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e aliqotado em dois eppendorfs distintos com 100µL cada para a realização do ensaio DPPH e em um terceiro eppendorf foi aliqotado 50 µL para a realização do ensaio TBARS.

Para a segunda forma de homogeneização foram separados aproximadamente 50 mg de córtex e adicionado 1 mL de tampão TRIS (0,1M) no Turrex em eppendorf de 2 mL. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado para análise de proteínas carboniladas.

### 2.6.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre *Di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium* (DPPH)

É uma das técnicas atualmente utilizada para detectar a presença de compostos antioxidantes, é um método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). Este método é considerado fácil, preciso, rápido, simples e econômico, sendo adequado para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras e misturas (Oliveira, G.L.S., 2014).

O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. (Nascimento et al., 2011)

Esse ensaio é realizado no escuro, protegido da luz. Acrescentamos 200 µL de uma solução a 0,25mM de DPPH diluído em etanol em 200 µL de amostra (1:1), que foi o nosso tubo “A”. Cada amostra possuía o seu branco, tubo “B”, onde continha a mostra misturada somente ao solvente etanol igualmente na proporção 1:1. Todos os tubos foram vortexados e incubados no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, as amostras são centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi pipetado em placas de 96 poços em duplicatas de 100µL e feito a leitura no espectrofotômetro a 517 nm.

### 2.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método de Buege e colaboradores (1978). A concentração de TBARS é baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídios oxidados. Em um tubo de vidro foram adicionados 50 µL do homogeinato por amostra e foram preparados mais três para ser o branco do ensaio utilizando 50 µL de tampão KPE. No mesmo tubo com amostra foram adicionados 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 35% diluído em água destilada mais 250 µL de Tris-HCl (pH 7,4) e foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 500 µL de solução NaSO<sub>4</sub> (sulfato de sódio) + TBA e posto para incubar em banho maria a 95°C por 45 minutos. Após a incubação, todas as amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos para serem adicionadas 500 µL de TCA 70% e vortexar. Passaram por uma última centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 530 nm. A concentração de TBARS foi calculada através da absorbância das amostras descontando o BRANCO/ 156000) \*31\*1000000 e expressa em nM/mg de massa.

### 2.6.4 Determinação de proteínas Carboniladas

Proteínas carboniladas são formadas via degradação de aminoácidos (Sledzinskie et al., 2008; Berlet e Stadman, 1997). Carbonilação é uma modificação irreversível de proteínas

causando alteração na estrutura, função e degradação proteica ( Dalle-Donne et al., 2006). A quantificação de proteínas carboniladas foi realizada utilizando-se método colorimétrico através da reação de 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) com o grupo carbonil das proteínas para formar hidrazona, um composto que pode ser detectado espectrofotometricamente a 370nm. (Reznick e Packer, 1994).

Para tanto, aproximadamente 50 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1mL de tampão Tris (0,1M) e depois centrifugado a 1500g a 4°C durante 10 minutos. Do sobrenadante resultante foram retirados 300 µL para quantificação de proteína carbonilada em triplicata. A esse sobrenadante acrescentou-se 700 µL de água e 2 mL de TCA 10%. A mistura foi agitada em mixer e centrifugada a 500 g a 4°C durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet acrescentou-se 1 mL de DNPH (nM) em tubos e 1 mL de HCl 2,5M em 1 dos tubos para determinação do branco. Os tubos foram incubados a 37°C na ausência de luz. Em seguida, adicionou-se 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% aos tubos, que permaneceram em banho de gelo durante 10 min. Os tubos foram novamente centrifugados a 500g a 4°C durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet resultante foi lavado 2 vezes com 2 mL de etanol:acetato de etila na proporção 1:1. Logo em seguida, os tubos foram mais uma vez centrifugados a 500g a 4°C durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet resultante foi ressuscitado em 2mL de guanidina (6 M) e incubado à temperatura ambiente durante 40 minutos, com agitação. A leitura colorimétrica das amostras a de seus respectivos brancos foi realizada em comprimento de onda de 370 nm.

## 2.7 Análises estatística

Os dados serão apresentados como médias e desvios padrões. Para todos os testes estatísticos o limite de significância foi de  $P < 0,05$  (bicaudal). Com o objetivo de minimizar a influência dos efeitos de ninhada, nós consideramos a média dos valores dos machos e das fêmeas de uma mesma ninhada e não valores individuais (Wainwright, 1998).

O teste exato de Fisher ( $2 \times 2$ ) foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos com relação às taxas de mortalidade. Análises de variância de repetição (rANOVA) foram realizadas para avaliar os dados de peso durante o tratamento (de PN2 até PN8) e o comportamento no teste de esquiva passiva. Análises de variância univariadas (uANOVA) foram utilizadas para avaliar os dados de peso em PN30 e os dados comportamentais no LCE

e no teste de nado livre. A exposição gestacional (CAF0, CAF1 ou CAF3), a exposição neonatal (ETOH0, ETOH25 ou ETOH 50) e o gênero foram usados como fatores de classificação (Between-Subjects Factors) tanto para as uANOVAs quanto para as rANOVAs.

A idade foi utilizada como fator de repetição e a sessão (Within-Subjects Factors). Para simplificar a apresentação dos resultados das rANOVAs, foram apresentados apenas os resultados dos testes univariados com os graus de liberdade corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser (Huynh e Feldt, 1976). ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações com valores de prova menores que 0,10 foram detectadas nas ANOVAs (Snedecor e Cochran, 1967). Testes FLSD (Fisher's Least Significant Difference Test) foram utilizados para as análises post hoc.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Consumo de líquido

Não houve diferença entre o consumo de líquido entre os grupos (Tabela 2). De acordo com os dados obtidos para o consumo de líquido corrigido pela massa dos animais foi possível estimar que as doses diárias de cafeína dos animais dos grupos CAF1 e CAF3 foram respectivamente de 20 e 60 mg/kg/dia.

Tabela 2 - Consumo médio de líquido durante 21 dias de exposição

Grupo	Valores absolutos (ml/dia)	Valores corrigidos pela massa (ml/g/dia)
CAF0	8,57 ± 2,95	0,19 ± 0,02
CAF1	7,65 ± 1,89	0,20 ± 0,01
CAF3	6,97 ± 2,16	0,18 ± 0,01

#### 3.2 Taxa de mortalidade

A maioria dos animais expostos à cafeína e/ou etanol sobreviveu até o final do período de testes comportamentais (Tabela 3). Os animais grupo ETOH50 que não consumiram cafeína apresentaram a maior taxa de mortalidade, contudo esta só foi significativamente diferente da dos animais do grupo ETOH25 que não consumiram cafeína e dos animais do grupo SALINA expostos a solução de cafeína 0,1 g/L.

Tabela 3 - Taxa de mortalidade e de sobrevivência dos animais dos grupos expostos a cafeína e etanol

Tratamento com cafeína	Exposição ao etanol	Animais Injetados em PN2	Número de animais mortos	Taxa de mortalidade
CAF0	SALINA	35	3	8,6%
	ETOH25	39	1	2,6% <sup>a</sup>
	ETOH50	38	8	21,1% <sup>a,b</sup>
CAF1	SALINA	47	2	4,3% <sup>b</sup>
	ETOH25	52	5	9,6%
	ETOH50	54	4	7,4%
CAF3	SALINA	37	5	13,5%
	ETOH25	39	5	12,8%
	ETOH50	48	4	8,3%

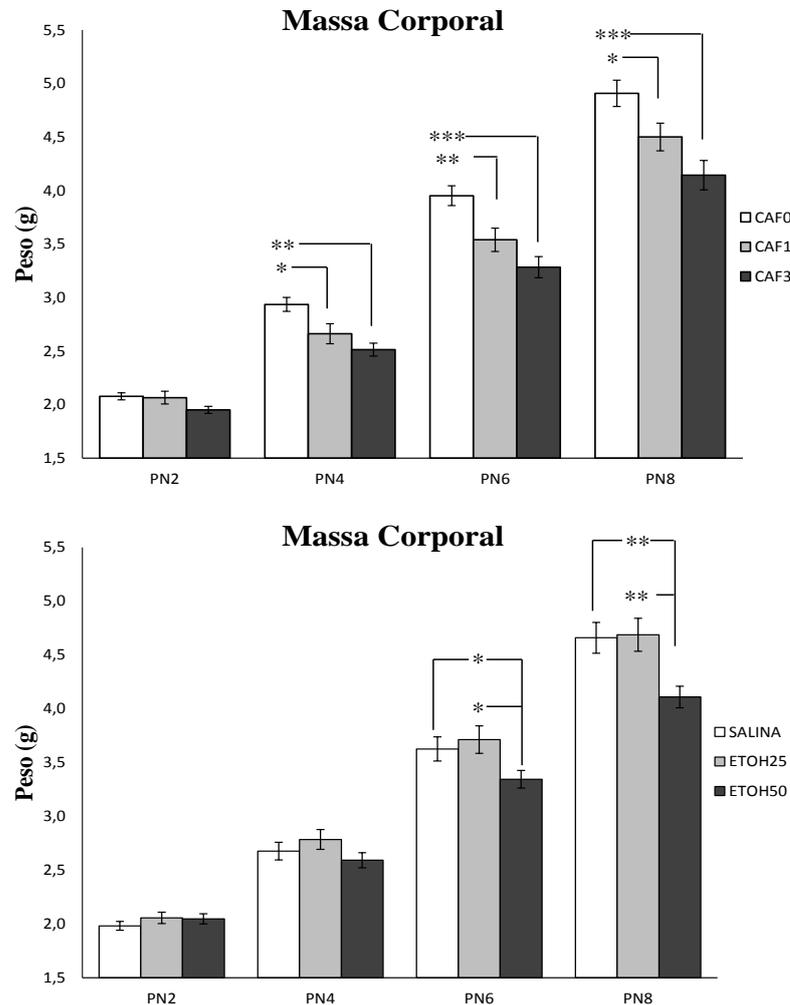
Legenda: As letras iguais indicam as comparações que alcançaram significância estatística. \*  $P < 0,05$ , Teste exato de Fisher.

### 3.3 Massa Corporal

De PN2 a PN8, período de exposição ao etanol, a massa corporal dos animais aumentou de modo marcante [IDADE:  $F(1,4/139,6 = 1.480,4, P < 0,001)$ ]. Contudo, este aumento foi menos evidente nos animais do grupo ETOH50 que, a partir de PN6, se tornaram mais leves que os animais dos grupos ETOH25 e ETOH0 [Idade  $\times$  Exposição neonatal:  $F(2,7/139,6 = 9,5; P < 0,001)$ ] (Figura 14).

A exposição à cafeína também afetou o ganho de massa dos animais de PN2 a PN8 [Exposição gestacional:  $F(2/109 = 7,2; P = 0,001)$ ; Idade  $\times$  Exposição gestacional:  $F(2/139 = 8,1; P = 0,001)$ ]. Após a primeira injeção de salina ou etanol, os animais do grupo CAF3 ganharam menos massa corporal do que os animais dos grupos CAF0 e CAF1 (Figura 14).

Figura 14 – Massa corporal dos animais durante a exposição ao etanol

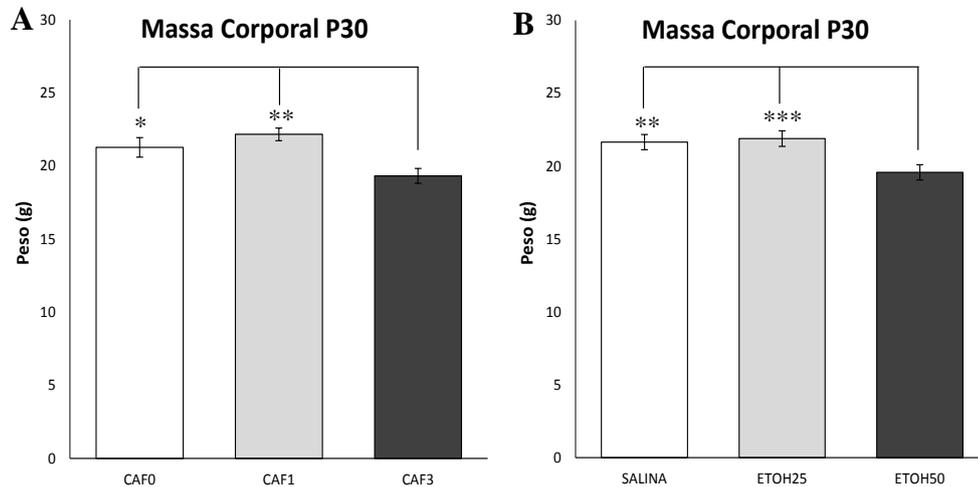


Legenda: Médias ( $\pm$  Erro padrão da média) da massa corporal dos animais. Em A, as massas dos animais expostos da gestação ao desmame à soluções de cafeína de 0,1g/L (CAF1) ou 0,3g/L (CAF3) ou água potável (CAF0). Notar que a exposição precoce ao etanol e a cafeína afetam negativamente o crescimento dos animais. Em B, as massas dos animais injetados do segundo ao oitavo dia pós-natal com 2,5g/kg de etanol (ETOH25), 5g/kg de etanol (ETOH50) ou salina (ETOH0). FLSD: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

Em PN30, a massa corporal dos animais do grupo CAF3 foi menor que a dos animais dos grupos CAF0 e CAF1 [Exposição gestacional:  $F(2/159) = 7,7$ ;  $P = 0,001$ ] e a massa corporal dos animais do grupo ETOH50 foi menor que a dos animais dos grupos ETOH0 e ETOH25 [Exposição Neonatal:  $F(2/159) = 6,2$ ;  $P < 0,01$ ]. Não foram observadas interações envolvendo a exposição ao etanol ou a cafeína. Também não observamos diferença entre a massa corporal de machos ( $21,4 \pm 0,4$  g) e fêmeas ( $20,0 \pm 0,4$  g) [Sexo:  $F(1/159) = 2,7$ ] nem

tampouco interações significativas envolvendo o sexo e a exposição à cafeína e/ou etanol (FIGURA 15).

Figura 15 – Massa corporal dos animais em PN30



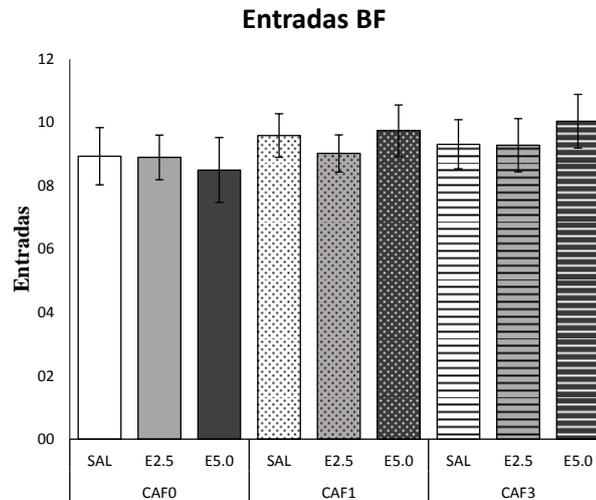
Legenda: Médias ( $\pm$  Erro padrão da média) da massa corporal dos animais na idade de PN30. Em A, as massas dos animais expostos da gestação ao desmame às soluções de cafeína de 0,1g/L (CAF1) ou 0,3g/L (CAF3) ou água potável (CAF0). Em B, as massas dos animais injetados do segundo ao oitavo dia pós-natal com 2,5g/kg de etanol (ETOH25), 5g/kg de etanol (ETOH50) ou salina (ETOH0). Notar que a exposição precoce ao etanol e a cafeína afeta negativamente o crescimento dos animais. FLSD: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

### 3.4 Análise Comportamental

#### 3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A análise do número de entradas nos braços fechados não revelou diferenças significativas entre machos ( $9,3 \pm 0,4$ ) e fêmeas ( $9,2 \pm 0,4$ ) nem foi afetada pela exposição à cafeína ou ao etanol (Figura 16).

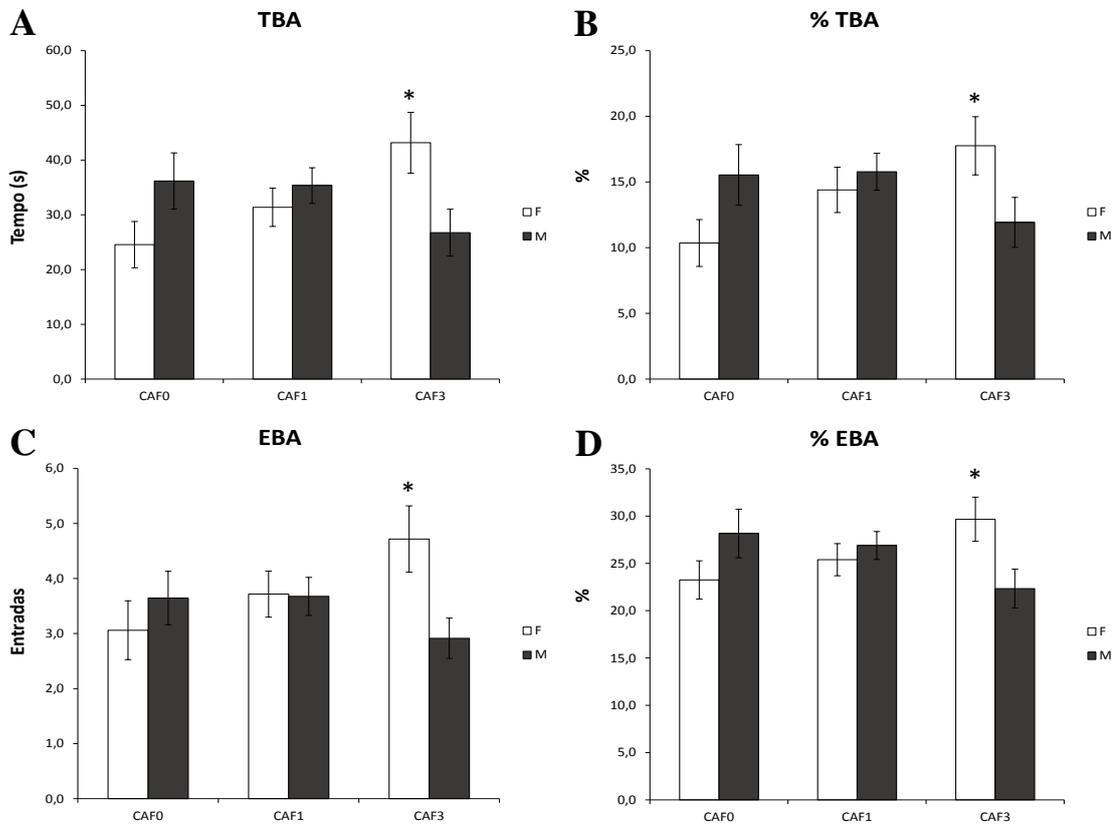
Figura 16 - Número de entradas nos braços fechados do LCE



Legenda: Médias ( $\pm$  Erro padrão da média) para o número de entradas nos braços fechados do LCM.

Em contraste ao observado para o número de entradas nos braços fechados, que é uma medida utilizada para análise da atividade locomotora, a cafeína afetou de modo dependente do sexo o comportamento associado à ansiedade as medidas do tempo no braço aberto [ $F(2/159) = 4,4$ ;  $P < 0,05$ ], do percentual de tempo no braço aberto [ $F(2/159) = 3,4$ ;  $P < 0,05$ ], do número de entradas no braço aberto [ $F(2/157) = 2,9$ ;  $P = 0,06$ ] e do percentual de entradas no braço aberto [ $F(2/158) = 4,3$ ;  $P < 0,05$ ]. Enquanto não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas nos grupos CAF0 e CAF1, no grupo CAF3, as fêmeas apresentaram maiores médias para as medidas do tempo no braço aberto (Figura 17A), do percentual de tempo no braço aberto (Figura 17B), do número de entradas no braço aberto (Figura 17C) e do percentual de entradas no braço aberto (Figura 17D).

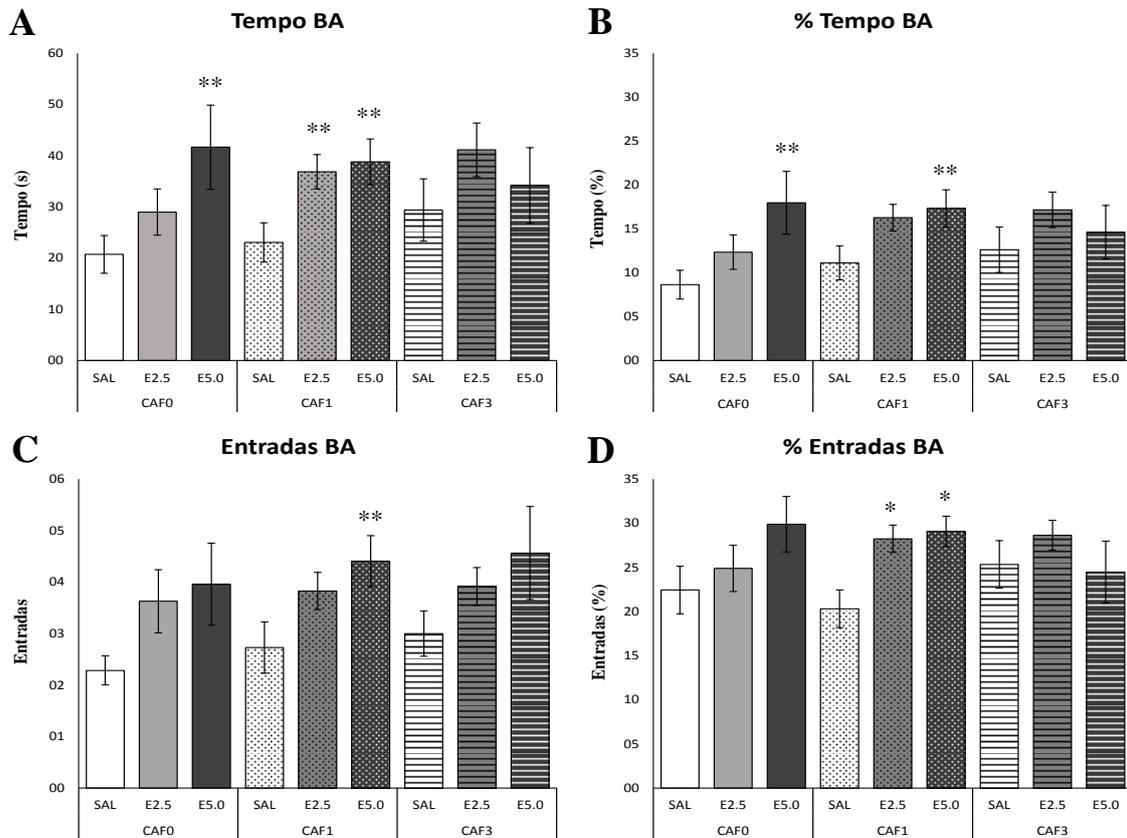
Figura 17 - Comportamento associado à ansiedade entre machos e fêmeas por grupo CAF



Legenda: Valores de medidas de comportamentos associados à ansiedade de machos e fêmeas separada pelos grupos CAF. Médias =  $\pm$  Erro padrão da média. FLSD: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  e \*\*\*  $P < 0.001$

As análises também revelaram um marcante efeito da exposição neonatal ao etanol para todas as variáveis utilizadas para avaliar o comportamento associado à ansiedade. Particularmente, quando comparados aos animais dos grupos ETOH25 e SALINA, os animais do grupo ETOH50 apresentaram maiores médias para as medidas do tempo no braço aberto [ $F(2/159) = 5,9$ ;  $P < 0,01$ ], do percentual de tempo no braço aberto [ $F(2/159) = 5,2$ ;  $P < 0,01$ ], do número de entradas no braço aberto [ $F(2/157) = 6,1$ ;  $P < 0,01$ ] e do percentual de entradas no braço aberto [ $F(2/158) = 4,1$ ;  $P < 0,01$ ] (Figura 18). De modo interessante, quando o efeito do etanol foi analisado separadamente em cada um dos grupos de animais expostos a cafeína, não foi possível identificar a diminuição do comportamento associado à ansiedade causado pela exposição ao etanol nos animais expostos a maior dose de cafeína em nenhuma das variáveis estudadas (Figura 18).

Figura 18 - Labirinto em Cruz Elevado com todos os animais

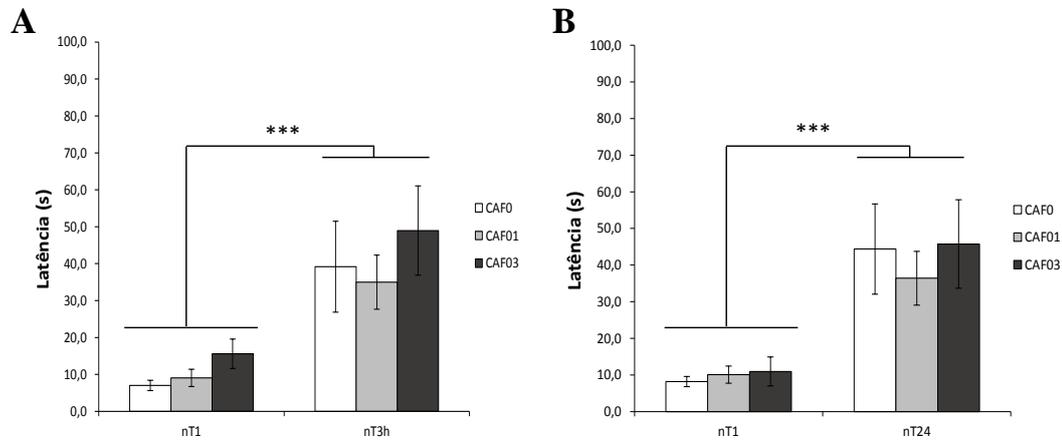


Legenda: Dados de todos os animais nos braços abertos (BA) separados pelos respectivos grupos de tratamento em PN30 no LCE. Em A, o tempo em segundos de permanência (TBA). Em B, a porcentagem do tempo de permanência (%TBA). Em C, o total de entradas no BA (EBA) e em D, o percentual de entradas (%EBA). Valores são médias  $\pm$  EPM, onde \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$  quando comparados aos seus respectivos grupos SAL.

### 3.4.2 Esquiva Passiva

A latência de descida da plataforma aumentou significativamente da primeira para a segunda sessão. Este resultado pode ser observado tanto para a sessão realizada três horas após o treino [ $F(1/119) = 87$ ;  $P < 0,001$ ] quanto para a sessão realizada vinte e quatro horas após o treino [ $F(1/117) = 88,2$ ;  $P < 0,001$ ] e não foi afetado pela exposição à cafeína (Figura 19).

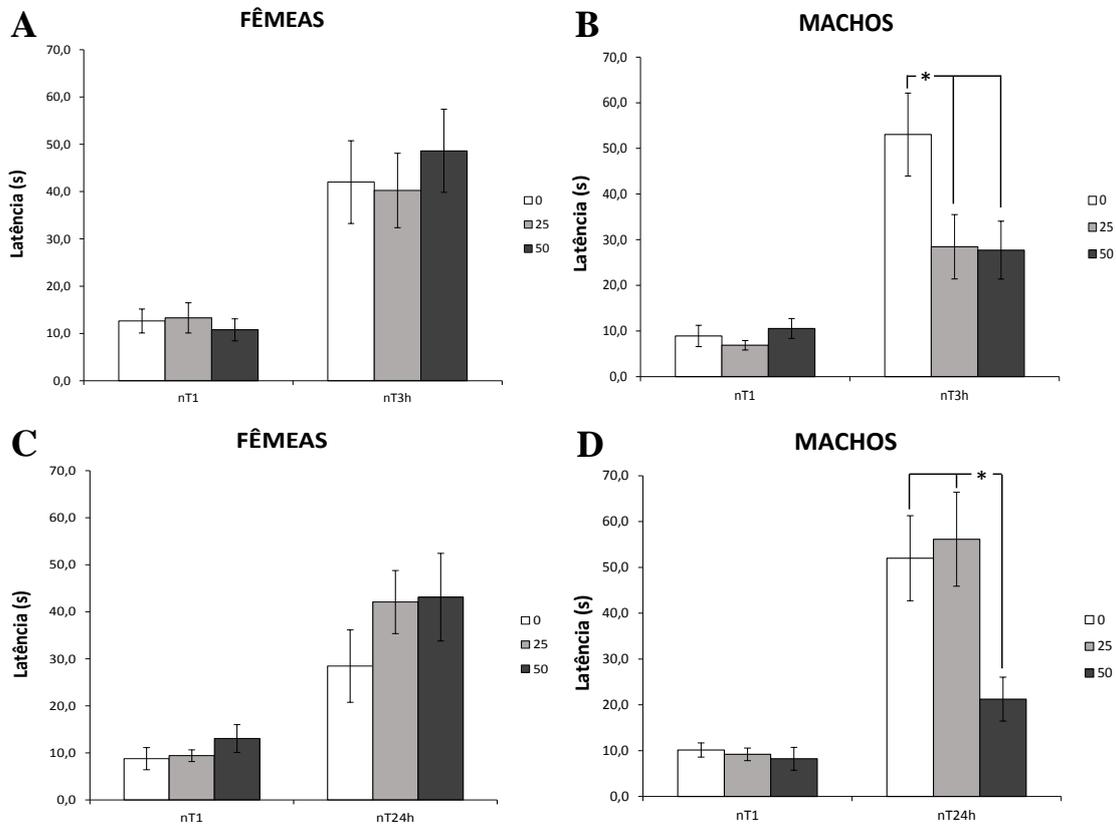
Figura 19 - Latência para descida da plataforma no teste de esQUIVA passiva



Legenda: Valores são médias  $\pm$  EPM, onde \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$  quando comparados aos seus respectivos grupos SAL.

A exposição ao etanol afetou de modo dependente do sexo a latência para a descida da plataforma tanto quando os animais foram testados 3h [Sessão x Sexo x Exposição neonatal:  $F(2/119) = 2,6$ ,  $P = 0,08$ ] quanto 24h choque [Sessão x Sexo x Exposição neonatal:  $F(2/117) = 3,0$ ,  $P = 0,05$ ; Sexo x Exposição neonatal:  $F(2/117) = 4,4$ ,  $P < 0,05$ ] após o choque. Enquanto o comportamento das fêmeas não foi afetado pela exposição ao etanol (Figura 20 A e C), os machos testados 3h após o choque dos grupos ETOH25 e ETOH 50 apresentaram latências menores que os do grupo Salina (Figura 20 B) e os machos do grupo ETOH50 testados 24h após o choque tiveram latências mais baixas que os dos grupos ETOH 25 e SALINA (Figura 20 D).

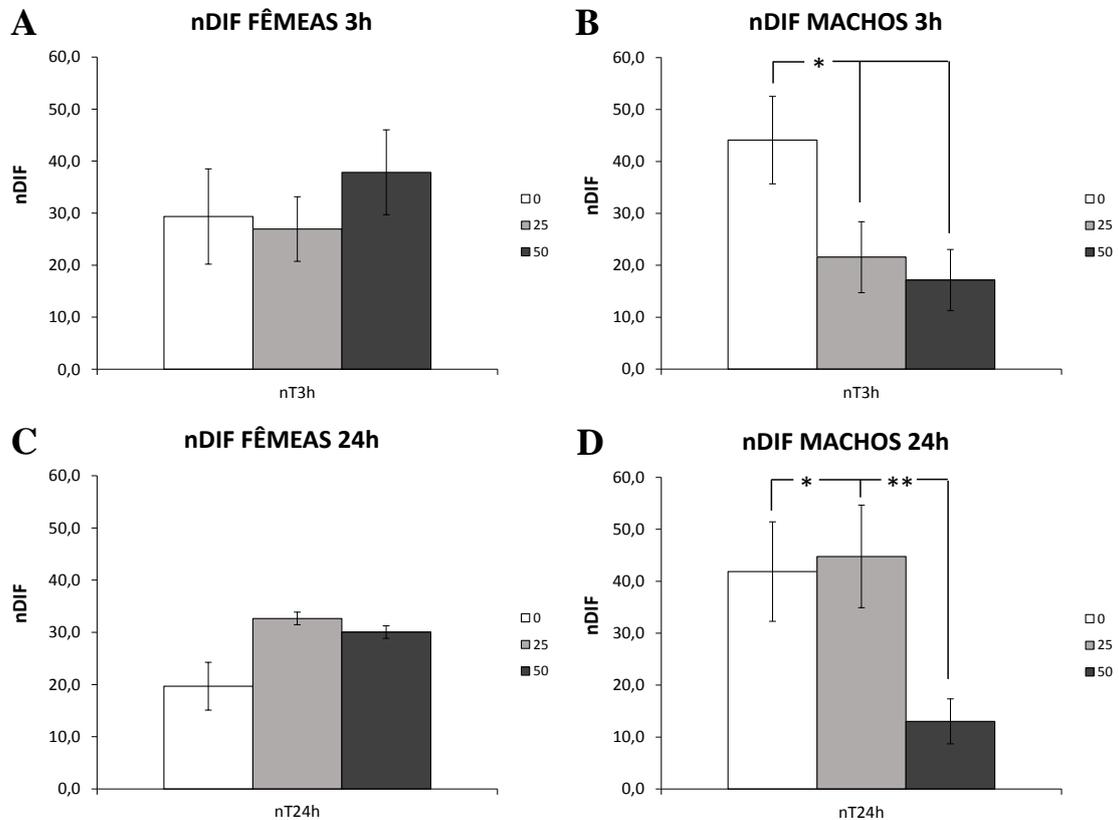
Figura 20 - Latência para descida da plataforma no teste de esQUIVA passiva separado por machos e fêmeas



Legenda: Dados de latência (s) dos animais na sessão nT3h e nT24h comparados a sessão de treino separado por sexo. Na figura B, a diferença entre os grupos ETOH25 e ETOH50 comparados ao seu respectivo SALINA. Em D, a diferença do grupo ETOH50 comparado ao ETOH25 e SALINA. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM, onde \* =  $P < 0,05$ .

Para o índice de aprendizagem e memória (DIF = diferença entre o treino e o teste), a exposição ao etanol afetou de modo dependente do sexo tanto os animais submetidos ao reteste 3h [Sexo x Exposição neonatal:  $F(2/136) = 2,6$ ;  $P < 0,08$ ] ou 24h [Sexo x Exposição neonatal:  $F(2/134) = 3,0$ ;  $P < 0,06$ ] após a primeira sessão. De modo semelhante ao observado para a latência para descida da plataforma, a exposição ao etanol não afetou o comportamento das fêmeas (Figura 21 A e C), mas afetou o comportamento dos machos (Figura XY B e D). Três horas após o choque, os machos dos grupos ETOH25 e ETOH 50 apresentaram valores de DIF menores que os do grupo Salina (Figura 21 B). Vinte quatro horas após o choque, os machos do grupo ETOH50 tiveram valores de DIF menores que os dos grupos ETOH 25 e SALINA (Figura 21 D).

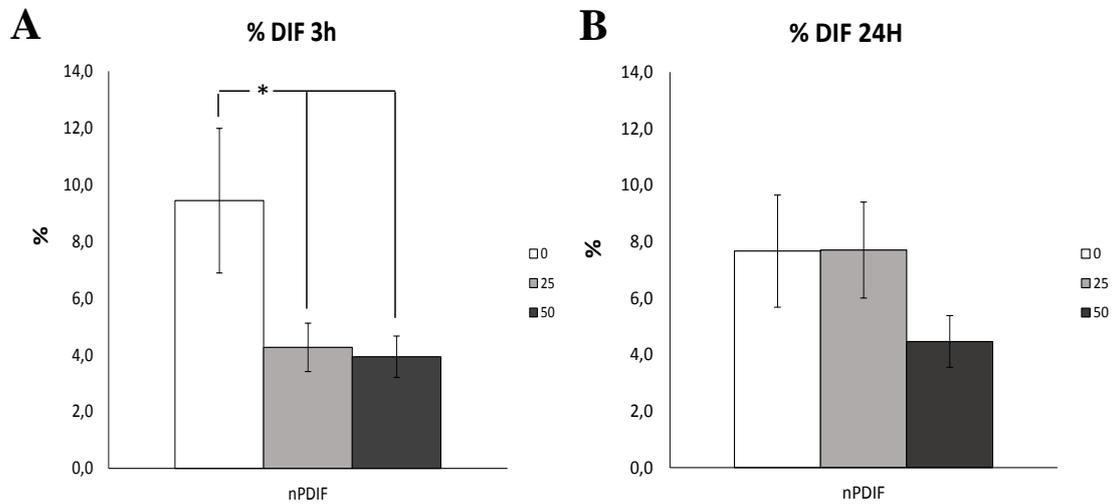
Figura 21 - Diferença entre as latências da segunda para a primeira sessão do teste de esQUIVA passiva (DIF)



Legenda: Valores de DIF (diferença entre o teste a sessão de treino0 dos animais na sessão nT3h e nT24h comparados entre machos e fêmeas. FLSD: \*\* =  $P < 0,01$  e \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM.

Para a variável %DIF, observamos apenas um efeito do etanol para o grupo de animais submetidos ao reteste 3h após o choque [Exposição neonatal:  $F(2/136) = 3,5$ ;  $P < 0,05$ ]. Os animais dos grupos ETOH 25 e ETOH 50 apresentaram valores menores que os do grupo SALINA (Figura 22A). O efeito da exposição ao etanol não foi observado no grupo de animais retestados 24h após o choque (Figura 22B).

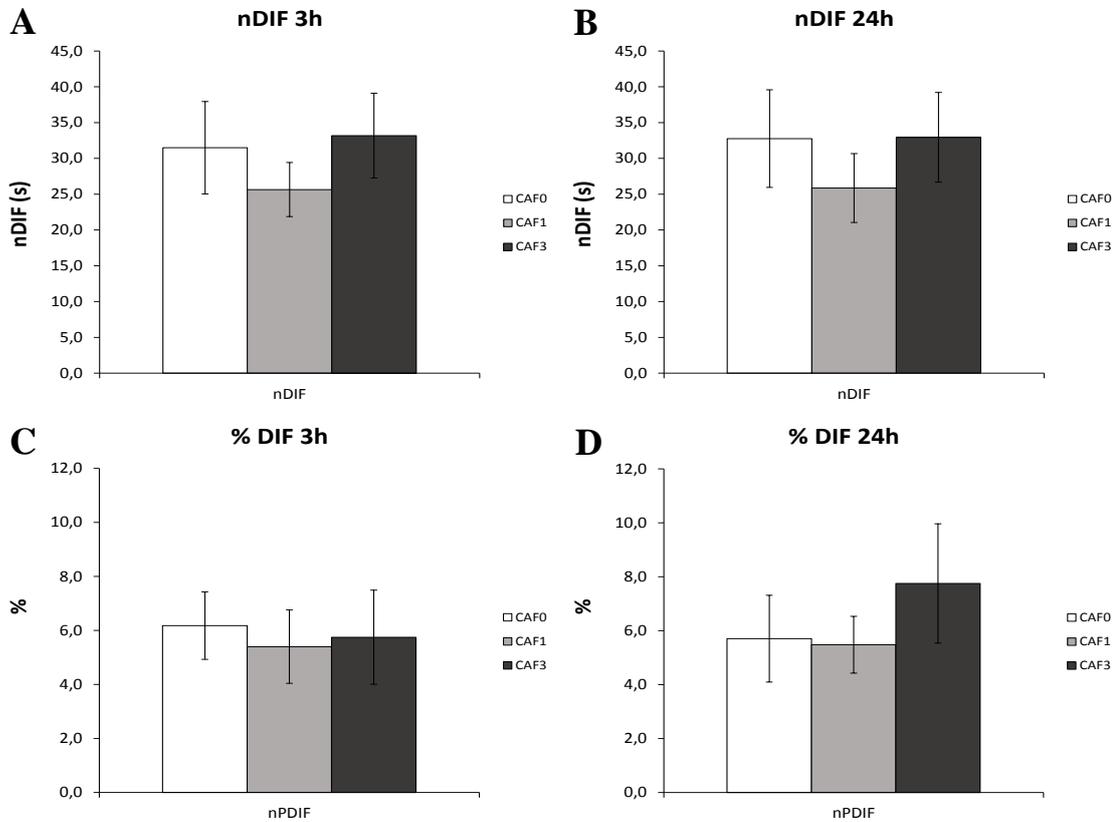
Figura 22 - Percentual da diferença entre as latências da segunda para a primeira sessão do teste de esquiua passiva (%DIF)



Legenda: Valores de %DIF dos animais na sessão nT3h e nT24h por grupo de etanol. \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM.

Tanto para DIF como para o %DIF, a exposição a cafeína não afetou o comportamento dos animais nem tampouco interagiu com o sexo ou a exposição ao etanol em nenhum dos intervalos utilizados para o reteste (FIGURA 23).

Figura 23 - Diferença (DIF) e percentual da diferença (%DIF) entre as latências da segunda para a primeira sessão do teste de esQUIVA passiva

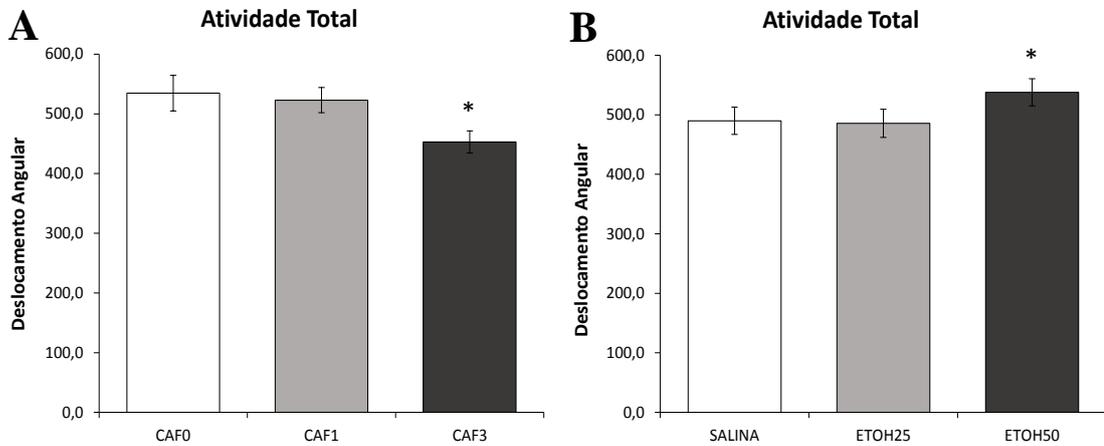


Legenda: Dados de da diferença entre a sessão teste e a de treino (DIF 3h = nT3h – nT1; DIF 24h = nT24h – T1). Os resultados são apresentados na forma de média ± EPM

### 3.4.3 Comportamento rotacional de nado forçado

A atividade natatória, medida pelo número total de deslocamentos angulares de 30°, das fêmeas ( $520,0 \pm 16,1$ ) foi maior que a dos machos ( $457,4 \pm 16,5$ ) [ $F(1/149) = 7,4$ ;  $P < 0,01$ ]. De modo interessante, a exposição à cafeína e ao etanol tiveram um efeito oposto sobre a atividade natatória. Enquanto os animais expostos a maior dose de cafeína apresentaram menor número de deslocamentos angulares [ $F(2/149) = 3,6$ ;  $P < 0,05$ ] (Figura 24A), os animais expostos a maior dose de etanol apresentaram maior número de deslocamentos angulares [ $F(2/149) = 3,4$ ,  $P < 0,05$ ] (Figura 24B).

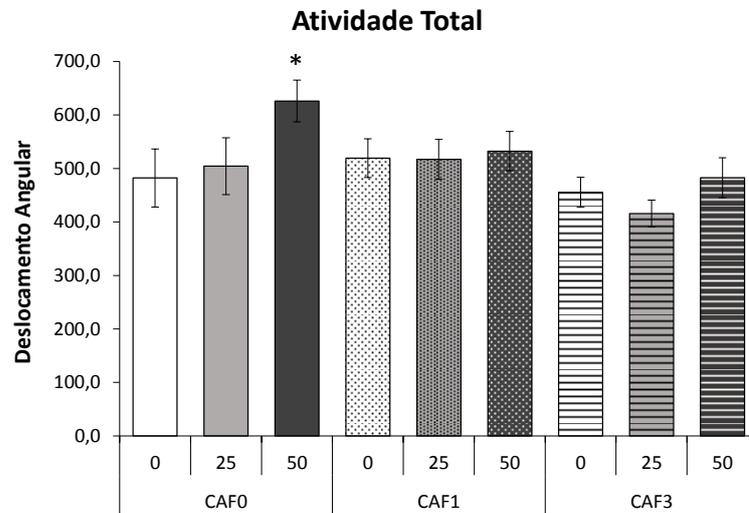
Figura 24 - Número total de deslocamentos angulares no teste de nado forçado



Legenda: Dados da atividade rotacional total. Em A, os valores de todos os animais separados por dosagem de cafeína (CAF 0 = 0,0 g/L, CAF1 = 0,1 g/L e CAF3 = 0,3 g/L e em B, estão separados por dosagem de etanol (ETOH0 = SALINA, ETOH25 = 0,25 µl/g e ETOH50 = 0,50 µl/g). Os resultados são apresentados na forma de média ± EPM. \* =  $P < 0,05$ .

Apesar da ausência de interação entre a cafeína e o etanol na atividade natatória [ $F(4/166) = 1,9$ ,  $P < 0,12$ ], quando o efeito do etanol no número total deslocamentos foi analisado separadamente em cada um dos grupos de animais expostos a cafeína, não foi possível identificar a hiperatividade natatória causada pela exposição ao etanol nos dois grupos de animais expostos à cafeína (Figura 25).

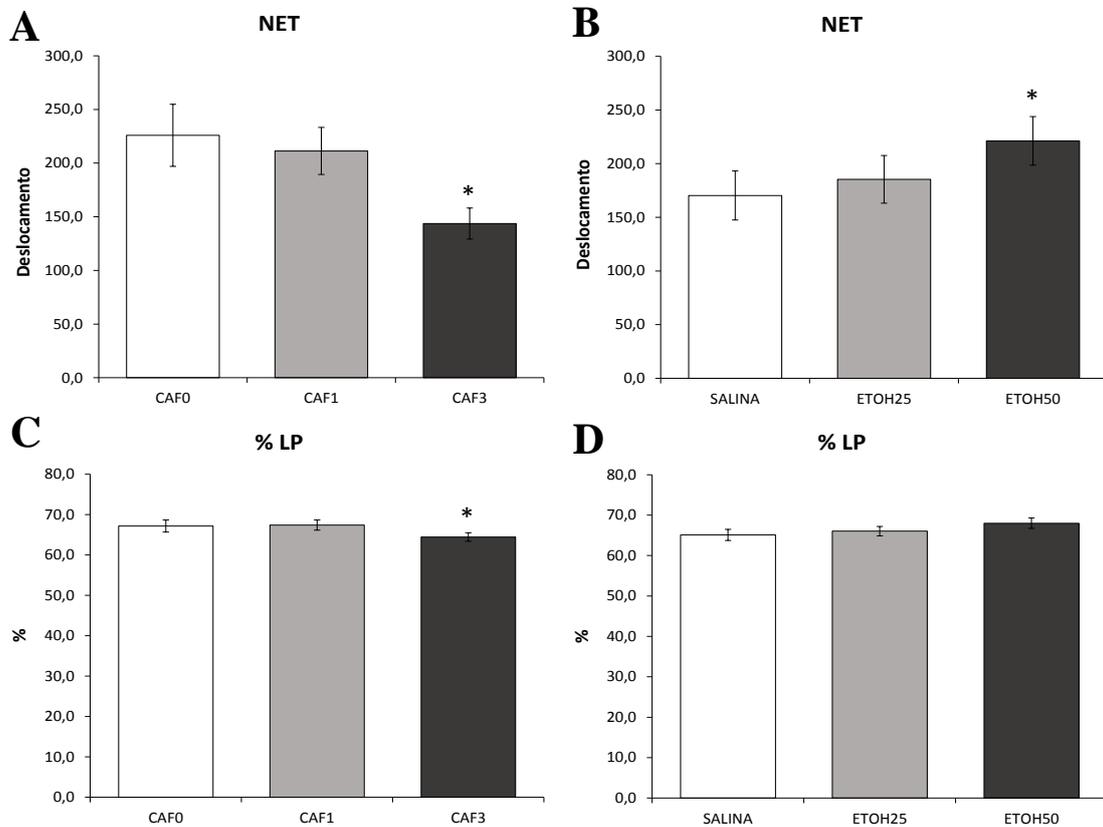
Figura 25 – Atividade total rotacional de todos os animais



Legenda: Dados da atividade rotacional total com todos os animais analisados juntos. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM. \* =  $P < 0,05$ .

Nesse estudo, utilizamos dois índices para avaliar a magnitude da lateralidade rotacional: o módulo da diferença entre os deslocamentos para a direita e para a esquerda (NET) e o percentual de rotação para o lado preferido (%LP). Para o módulo da diferença entre os deslocamentos para a direita e esquerda (NET), observamos uma interação significativa entre a exposição à cafeína e ao etanol [ $F(4/156) = 2,5$ ;  $P < 0,05$ ]. No grupo de animais que não foi exposto a cafeína (CAF0) ou exposto à dose intermediária (CAF1), a exposição ao etanol promoveu um aumento da magnitude da assimetria rotacional que não foi observado nos demais grupos de animais expostos à dose de cafeína mais elevada (CAF3) (Figura 26A). Resultado semelhante foi observado para o %LP [Interação Exposição à cafeína x Exposição ao etanol:  $F(4/166) = 2,2$ ,  $P = 0,07$ ] (Figura 26B).

Figura 26 - Índices de magnitude da lateralidade rotacional: módulo da diferença entre o número de rotações para esquerda e direita (NET) e percentual de deslocamento para o lado preferido (%LP)



Legenda: Dados da atividade NET e %LP com todos os animais analisados separadamente por grupo de cafeína (A e C) e etanol (B e D). Os resultados são apresentados na forma de média ± EPM. \* =  $P < 0,05$ .

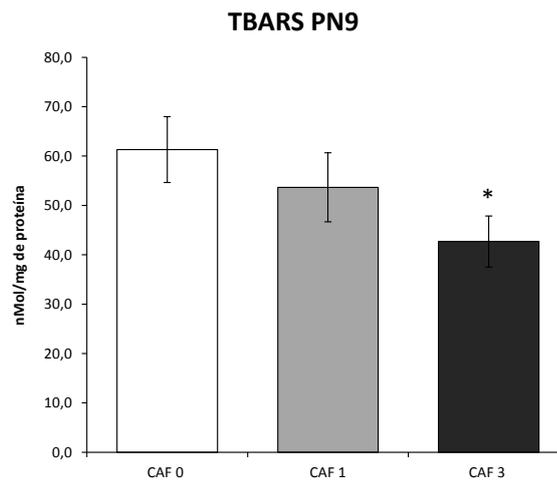
Em relação ao percentual de deslocamentos para a direita (%R), índice utilizado para avaliar a magnitude e a direção da assimetria, as análises não indicaram efeitos significativos da exposição à cafeína ou ao etanol nem tampouco interações envolvendo esses fatores.

### 3.5 Análise Bioquímica do Estresse Oxidativo no córtex cerebral

#### 3.5.1 TBARS

Na idade PN9, a análise das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico revelou efeito apenas da cafeína no grupo dos animais que foram submetidos à dose mais alta [ $F(2/32) = 3,8$ ;  $P < 0,05$ ], apresentando valores menores que os encontrados nos grupos CAF0 e CAF1 (FIGURA 27).

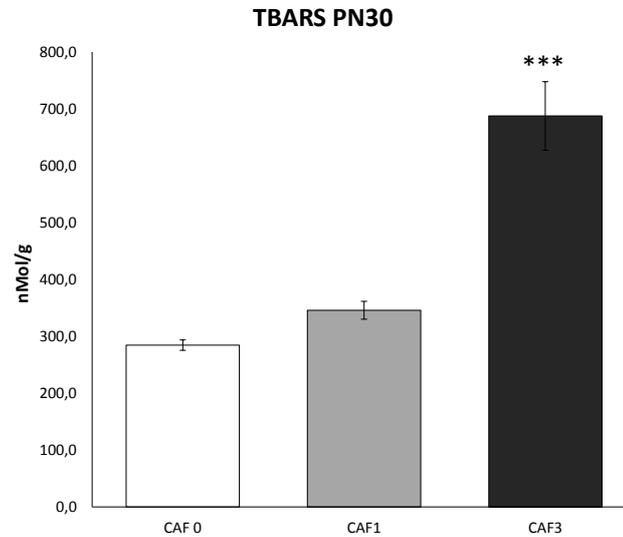
Figura 27 - Dados de TBARS em neonatos



Legenda: Dados do ensaio TBARS em PN9 separados por grupo de cafeína. O grupo CAF3 diferiu somente do grupo CAF0. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM, onde \* =  $P < 0,05$ .

Já em PN30, as concentrações de TBARS dos machos ( $444,3 \pm 20,9$ ) foram maiores do que o das fêmeas ( $379,8 \pm 19,7$ ) [Sexo:  $F(1/63) = 5,0$ ;  $P < 0,05$ ], porém não houve interação entre os tratamentos utilizados com o sexo. Assim como observado para as análises realizadas nos animais em PN9, somente a cafeína foi capaz de afetar os valores do ensaio [ $F(2/80) = 48,1$ ;  $P < 0,001$ ]. Contudo, em PN30, a cafeína aumentou significativamente a quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no grupo CAF3 (FIGURA 28)

Figura 28 - Dados de TBARS em pré-púberes

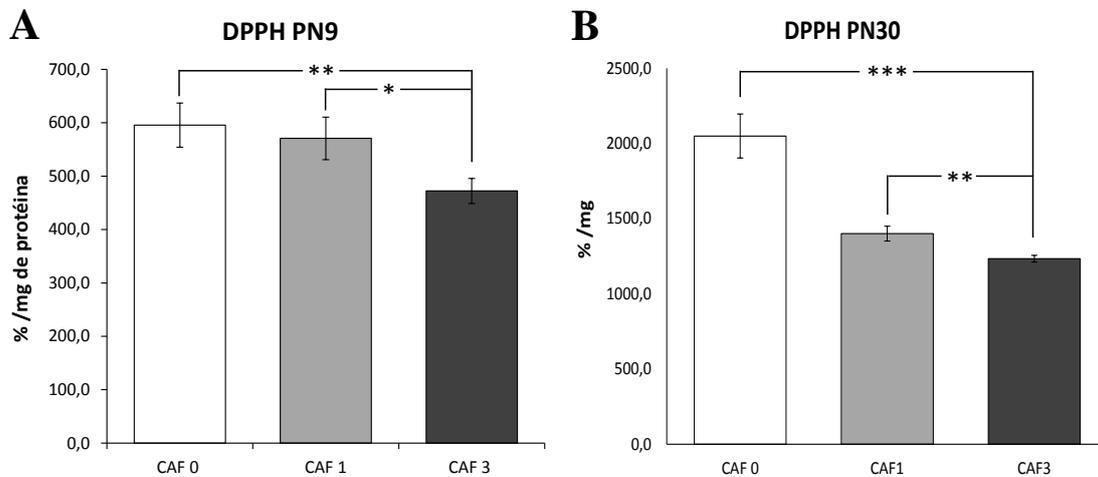


Legenda: Dados do ensaio TBARS em PN30 separados por grupo de cafeína. A figura mostra a diferença do grupo CAF3 comparado aos grupos CAF0 e CAF1. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM, onde \*\*\* =  $P < 0,001$ .

### 3.5.2 DPPH

A exposição ao etanol não afetou de forma significativa a capacidade antioxidante, medida pelos níveis do radical DPPH, em nenhuma das idades. Em contraste, a exposição à cafeína foi capaz de reduzir os níveis do radical DPPH tanto em PN9 [ $F(2/32) = 4,6$ ;  $P < 0,05$ ] como em PN31 [ $F(2/58) = 9,1$ ;  $P < 0,001$ ]. Em PN9, os animais do grupo CAF3 apresentaram valores menores que os dos grupos CAF0 e CAF1 (Figura 29A). Em PN30, os dois grupos de animais expostos a cafeína (CAF1 e CAF3) tiveram valores menores que os dos animais não expostos (FIGURA 29B).

Figura 29 - Dados DPPH em animais neonataos e pré púberes

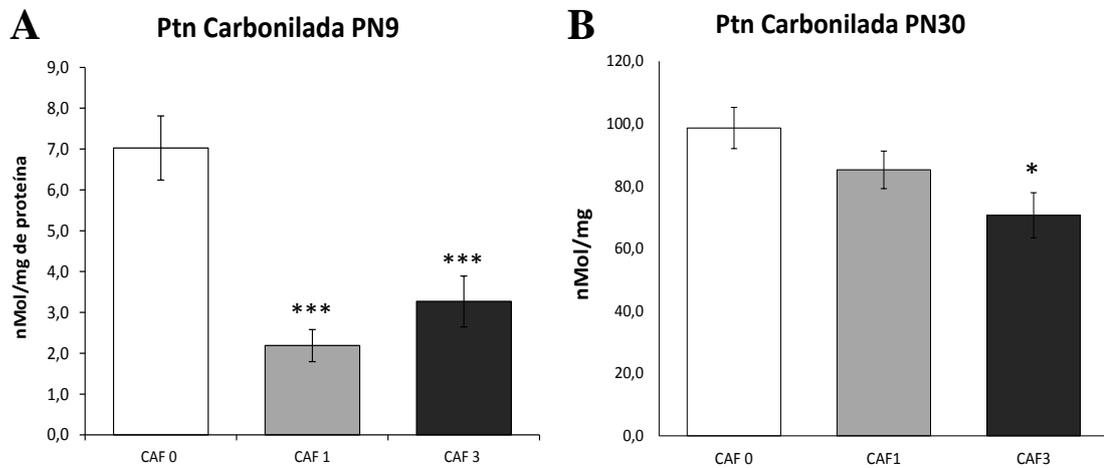


Legenda: Dados do ensaio DPPH em PN9 e PN30 separados por grupo de cafeína. Em A e B é possível ver a diferença do grupo CAF3 comparado aos grupos CAF0 e CAF1. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM, onde \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  e \*\*\* =  $P < 0,001$ .

### 3.5.3 Proteína Carbonilada

De modo semelhante ao observado para os demais biomarcadores do estresse oxidativo utilizados neste estudo, o ensaio para quantificar as proteínas carboniladas mostrou que somente a cafeína afetou de forma significativa os valores encontrados tanto em PN9 [Exposição gestacional:  $F(2/32) = 20,2$ ;  $P < 0,001$ ] quanto em PN30 [Exposição gestacional:  $F(2/59) = 3,5$ ;  $P < 0,05$ ]. Contudo, para os níveis de proteína carbonilada, enquanto, em PN9, os dois grupos de animais expostos a cafeína (CAF1 e CAF3) tiveram valores significativamente menores que os dos animais não expostos (Figura 30A), em PN30, apenas os animais do grupo CAF3 apresentaram menores valores que os do grupo não exposto (FIGURA 30B).

Figura 30 - Dados de proteína carbonilada em neonatos e pré-púberes



Legenda: Dados do ensaio de Proteína Carbonilada em PN9 e PN30 separados por grupo de cafeína. Em A, é mostrado a diferença entre os grupos CAF1 e CAF3 comparados ao grupo CAF0 respectivamente. Em B, o grupo CAF3 diferiu somente do grupo CAF0. Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  EPM, onde \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  e \*\*\* =  $P < 0,001$ .

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Resumo dos resultados

Apesar das evidências epidemiológicas do uso combinado da cafeína e etanol, as interações entre estas substâncias têm recebido pouca atenção em estudos experimentais. Nesse estudo avaliamos os efeitos da exposição à cafeína e/ou etanol durante o desenvolvimento em comportamentos associados à ansiedade, à memória e aprendizado e o comportamento rotacional no nado livre em camundongos pré-púberes. Além disso, avaliamos se houve alteração de alguns biomarcadores de estresse oxidativo no córtex cerebral em animais neonatos e em pré-púberes que foram expostos à cafeína e/ou etanol durante o desenvolvimento. Para tanto, os animais foram expostos a solução de cafeína em duas concentrações (0,1 e 0,3 g/L) desde o início da gestação até o desmame e, em dias alternados de PN2 até PN8, receberam uma injeção intraperitoneal de 0,25 ou 0,50 µl/g de etanol. Em PN9 e PN30 foram coletados tecidos do córtex para avaliação bioquímica dos marcadores de estresse oxidativo e em PN30 também, aconteceram os testes comportamentais.

De acordo com o observado em outros estudos (Filgueiras e Manhães, 2004; Filgueiras *et al.*, 2006), a maioria dos animais expostos ao etanol sobreviveu até o dia do teste comportamental. No primeiro dia de pesagem, PN2, não houve diferença de massa corporal entre as ninhadas expostas as diferentes doses de cafeína, porém, de PN2 a PN8, o grupo exposto a maior dose de cafeína apresentou um ganho de massa menor que o grupo exposto a menor dose de cafeína ou à água. Esta diferença se manteve até o período de testes comportamentais. De modo semelhante ao observado para a cafeína, os animais do grupo ETOH50 tiveram um ganho de massa corpórea menor que os dos grupos ETOH25 e SALINA de PN2 a PN8 e se mantiveram mais leves em PN30.

No teste do labirinto em cruz elevado, a cafeína afetou de forma diferente cada sexo. No grupo de animais expostos a maior dose de cafeína, as fêmeas do grupo apresentaram comportamento menos ansioso que os machos. Já em relação a exposição ao etanol, não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas. Contudo, os animais do grupo ETOH50

apresentaram comportamento menos ansioso quando comparados aos animais dos grupos SALINA e ETOH25.

No teste de esquivada passiva, a exposição ao etanol afetou o comportamento dos machos, mas não o das fêmeas. Na sessão realizada 3h hora após o primeiro teste, as latências para a descida da plataforma dos machos expostos à ambas as doses de etanol foram menores que os animais injetados com salina. Na sessão realizada 24h após o primeiro teste, somente os machos do grupo ETOH50 apresentaram a latência de descida menor que os dos grupos ETOH25 ou salina. Em relação aos índices utilizados para avaliar o aprendizado e memória (DIF e %DIF), na sessão realizada 3h após o choque, os machos expostos a ambas as doses de etanol apresentaram valores menores que os machos do grupo salina. Na sessão realizada 24h após o choque, apenas para os valores de DIF os machos do grupo ETOH50 foram menores que os grupos SALINA e ETOH25.

No comportamento rotacional, as fêmeas possuem um número maior de deslocamentos angulares que os machos. De modo interessante, enquanto os animais expostos a maior dose de cafeína apresentaram menor número de deslocamentos angulares, os animais expostos a maior dose de etanol apresentaram maior número de deslocamentos. Ao analisar os índices de magnitude da lateralidade rotacional (NET e %LP), foi possível observar a exposição ao etanol promoveu um aumento da lateralidade no grupo de animais que não foram expostos a cafeína

Para a avaliação dos valores relacionados ao estresse oxidativo foram analisadas, em PN9 e PN30, as espécies reativas ao ácido tiobarbutúrico (TBARS), a capacidade antioxidante (DPPH) e as proteínas carboniladas ou carbonilação de proteínas. De modo geral, apenas a cafeína foi capaz de alterar os níveis de estresse oxidativo. Para o TBARS, a dose mais alta de cafeína diminuiu os valores de espécies reativas em PN9, mas aumenta em PN30. Em relação ao DPPH, os valores são menores no grupo CAF3 quando comparados aos grupos CAF0 e CAF1 nas duas idades estudadas. Já as análises das proteínas carboniladas, em PN9, todos os animais expostos à cafeína possuíam valores menores que os animais expostos somente a água, enquanto que em PN30, somente o grupo CAF3 diferiu dos animais expostos a água, mas não dos animais do grupo CAF1.

## 4.2 Vias de administração das substâncias

Neste estudo, a cafeína foi administrada por via oral em conjunto com a única fonte de água que os animais tinham acesso. Esta via de administração é amplamente utilizada para o estudo dos efeitos da cafeína durante o desenvolvimento. Neste paradigma, o consumo de cafeína se dá de modo fracionado ao longo do dia simulando a situação mais comum em humanos (Lorenzo et al., 2010; Picard et al., 2008; Soellner et al., 2009). A ausência de diferenças no consumo de líquidos entre os grupos que expostos à cafeína e água potável sugere, que nas concentrações utilizadas neste estudo, o gosto da cafeína não é aversivo aos animais.

As doses de cafeína de 20 e 60 mg/kg/dia obtidas neste estudo estão em acordo com outros estudos realizados em ratos e camundongos utilizando soluções com as mesmas concentrações de cafeína (Bjorklund et al., 2008; Nakamoto et al., 1991; Picard et al., 2008) e estão bem abaixo da faixa de dose ( $>150$  mg/kg) em que são observadas malformações orgânicas e abortos em roedores (Fernandes et al., 1998). Se considerarmos uma simples extrapolação para a massa corporal de um humano de 60 Kg, as doses de cafeína de 20 e 60 mg/kg corresponderiam ao respectivo consumo diário de 14 e 42 xícaras de café (assumindo que uma xícara contém 85 mg de cafeína). Contudo, como o metabolismo da cafeína difere entre roedores e humanos e a meia vida da cafeína é muito menor em roedores (0,7 a 1,2 h) do que em humanos (2,5 a 4,5 h), alguns autores propõem que a extrapolação da dose de cafeína deve considerar as diferenças entre as taxas metabólicas de roedores e humanos (Fredholm et al., 1999; Nehlig e Debry, 1994). Uma estratégia utilizada em estudos pré-clínicos e em procedimentos veterinários consiste em calcular o peso metabólico (massa corpórea do roedor = massa corpórea humana  $^{0,75}$ ) (Sharma e McNeill, 2009). Com base neste método de estimativa de dose, o consumo de 20 e 60 mg/Kg observado em nosso estudo corresponderia respectivamente ao consumo humano diário de 5 e 15 xícaras de café, o que estaria em uma faixa de consumo de moderado a alto, para um humano adulto de 60 Kg.

Com relação ao etanol, a opção de administração por via intraperitoneal se baseou no fato de que esta via vem sendo utilizada nos estudos realizados por nosso grupo em camundongos Suíços (Filgueiras et al., 2009b; Nunes et al., 2011) e em ratos (Filgueiras et al., 2010). Apesar do caráter invasivo das injeções e o estresse causado pela manipulação dos animais durante o período de exposição, esta técnica tem como aspectos positivos a simplicidade e a rapidez com que as drogas atingem o sistema nervoso central. Além disso, a

dose de etanol pode ser corrigida facilmente pela massa dos animais e os níveis de etanol sérico obtidos com esta técnica se assemelham às doses que um feto humano pode ser exposto após a ingestão materna de uma dose de álcool de moderada à alta (Filgueiras et al., 2009b; Nunes et al., 2011). Vale mencionar ainda que a baixa taxa de mortalidade observada neste estudo está de acordo com as obtidas em outros estudos realizados por nosso grupo (Filgueiras et al., 2009b; Filgueiras et al., 2010; Nunes et al., 2011) e sugerem que a injeção intraperitoneal, por si só, não provoca dano significativo em órgãos vitais.

#### **4.3 Efeitos da cafeína e do etanol no ganho de massa corpórea**

Neste estudo, os animais expostos à solução de cafeína de 0,3 g/L apresentaram massa corporal igual aos animais expostos a solução de cafeína de 0,1 g/L e os animais cujas mães beberam água potável em PN2. Contudo, apresentaram desenvolvimento mais lento a partir de PN4 e se mantiveram mais leves ao longo do período de exposição ao etanol. Estes dados estão em acordo com estudos em humanos que mostraram que a exposição crônica à cafeína durante o período fetal/neonatal diminui a massa corpórea dos fetos, a massa corpórea pós-natal e altera diversas características físicas do desenvolvimento (Nehlig e Debry, 1994). Estudos epidemiológicos mostraram uma redução dependente da dose no peso de nascimento quando as mães consomem durante a gestação mais de 6 xícaras de café ou 540 mg de cafeína por dia (Bakker et al., 2010). Outros estudos têm descrito uma redução de peso dependente da dose com um consumo diário de doses superiores a 2,5 xícaras de café ou 150 mg de cafeína durante a gestação (Fernandes et al., 1998). Ainda que mecanismos os responsáveis pela redução de peso ao nascer causada pela cafeína ainda permaneçam desconhecidos, nossos dados sugerem que o período de surto do crescimento cerebral pode ser um período crítico para a manifestação dos efeitos na cafeína no ganho de massa corporal. Deve-se mencionar ainda que alguns autores sugerem que a redução de peso causada pela cafeína pode estar associada com a exposição concomitante a alguns fatores que estão etiologicamente associados com a redução de peso em neonatos como o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas (Brent et al., 2011). Essa possibilidade é confirmada pelos nossos dados, uma vez que o peso dos animais neonatos somente diferiu significativamente após a primeira exposição ao etanol, tanto no grupo CAF1 quanto no grupo CAF3, sendo esse o grupo onde os animais apresentaram um desenvolvimento menor ainda.

Durante o período de exposição, a administração ao etanol promoveu um atraso no ganho de peso dos animais. Estes dados são consistentes com outros estudos mostrando uma redução do peso corpóreo em roedores expostos ao etanol durante a gestação e o período neonatal (Nehlig e Debry, 1994). Além disso, nossos dados também estão de acordo com a ideia, já bem estabelecida, de que o consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação é capaz de promover um retardo no crescimento corpóreo durante a infância (Jones et al., 1973; Jones e Smith, 1973). Alguns autores têm associado o retardo no crescimento decorrente da exposição gestacional ao etanol com uma redução dos níveis de hormônio do crescimento (Blaine et al., 1999; Conway e Swain, 1997). Esta possibilidade, contudo, parece não ser o único fator responsável pelo retardo no crescimento nos animais expostos ao etanol. Especialmente se considerarmos os próprios estudos realizados por nosso grupo em que o etanol era injetado em todos os animais de uma ninhada (Filgueiras *et al.*, 2009b; Nunes *et al.*, 2011). Nesta condição, não observamos redução no ganho de peso, mesmo quando os animais eram injetados com 5 g/Kg de etanol nas mesmas idades (uma injeção ip em PN2, PN4, PN6 e PN8). Se a redução da produção de hormônio do crescimento fosse o único fator envolvido, o retardo no crescimento independeria de as injeções serem feitas em todos os filhotes ou em uma parte da ninhada. Desta forma, outros fatores podem exercer seu papel para a diminuição do ganho de peso dos animais expostos ao etanol.

O etanol, devido a sua capacidade de bloquear os receptores NMDA e ativar os receptores GABAA (Ikonomidou, 2009), pode afetar o ganho de peso por uma série de outros fatores não associados diretamente com o hormônio do crescimento, como por exemplo, o metabolismo basal, a ingestão de leite e a atividade motora dos filhotes. Particularmente, foi demonstrado que o bloqueio dos receptores NMDA prejudica a geração da atividade rítmica dos neurônios do tronco cerebral que integram a circuitaria responsável pelos movimentos reflexos da mandíbula durante a amamentação (Kogo *et al.*, 1996; Turmanjr *et al.*, 1999). Na primeira semana pós-natal, a administração de agonistas dos receptores GABAA tem um efeito sedativo em camundongos (Liljelund *et al.*, 2005). Como os níveis séricos de etanol se mantêm elevados por pelo menos sete horas em camundongos (dados não publicados), é possível que durante este período os animais injetados com etanol estejam impossibilitados de ingerir leite. Assim, os filhotes injetados com salina, que se mantem ativos o tempo todo, podem ter um aumento significativo da oferta de leite e com isso apresentar um ganho de massa superior ao grupo tratado com etanol.

Apesar dos trabalhos mostrando que tanto a exposição à cafeína como ao etanol reduzem a massa corporal ao nascer, não há estudos epidemiológicos verificando se este

afeito pode ou não ser reparado com o desenvolvimento subsequente (Brent et al., 2001). Muitos fatores que promovem o retardo no crescimento no útero (anormalidades cromossômicas, infecções no útero teratogênicas ou não, privação nutricional) são permanentes e não são efetivamente recuperados na infância, como sugerem nossos dados em PN30 (início da adolescência), onde os animais do grupo CAF3 e ETOH50 são mais leves que os demais grupos. Contudo, esta questão deve ser melhor investigada com a análise de outras medidas, além da massa corporal, como o comprimento rostro-caudal e a proporção de gordura visceral.

#### **4.4 A cafeína afetou de modo dependente do sexo o comportamento no LCE**

No LCE, os níveis de ansiedade são medidos pela tendência que os roedores apresentam de evitar os braços abertos do labirinto, quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985b; Pellow e File, 1986). Quando ratos e camundongos são forçados a permanecerem nesses braços, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticoides plasmáticos (Pellow *et al.*, 1985a) e conseqüentemente, permanecem um tempo maior nos braços fechados.

Em nosso trabalho, as fêmeas do grupo CAF3 apresentaram níveis menores de ansiedade quando comparados aos machos do grupo exposto a mesma dose de cafeína. A ausência de diferenças entre machos e fêmeas nos outros grupos contrasta com alguns estudos que mostram que as fêmeas são menos ansiosas que os machos no LCE (Archer, 1975; Farabollini *et al.*, 1987; Johnston e File, 1991; Shansky e Woolley, 2016). Contudo, em um estudo recente, onde a exposição à cafeína se deu de forma semelhante a nossa (em doses e período de exposição), as fêmeas púberes foram menos ansiosas que os machos no teste LCE (Ardais *et al.*, 2016). De modo semelhante, em ratos Wistar adultos que consumiram uma solução de cafeína (0,3 g/L) durante o período noturno por 30 dias também foi observada uma diminuição do comportamento ansioso nas fêmeas, mas não nos machos (Sallaberry *et al.*, 2018). Como a maioria dos efeitos da cafeína são devidos ao antagonismo dos receptores de adenosina (Fredholm *et al.*, 2005), é provável que as ações ansiogênicas ou ansiolíticas da droga provenham do antagonismo de diferentes subtipos, especialmente A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (Correa e

Font, 2008; Cunha *et al.*, 2008), com a possibilidade distinta de que o antagonismo dos receptores  $A_{2A}$  possa ser a base da ansiólise (Yamada *et al.*, 2014). De modo interessante, o consumo de cafeína durante a gestação provocou uma diminuição significativa no nível de RNAm que codifica o receptor  $A_{2A}$  (32%) no cérebro das mães (Lorenzo *et al.*, 2010). Desta forma, é possível especular que o comportamento menos ansioso das fêmeas do grupo CAF3 esteja relacionado a uma diminuição mais acentuada da função dos receptores  $A_{2A}$  causada pela exposição à cafeína durante o desenvolvimento.

#### 4.5 A exposição ao etanol reduziu o comportamento associado a ansiedade

A exposição ao etanol também afetou o comportamento dos animais no LCE, contudo, de modo independente do sexo. Particularmente, tanto os machos como as fêmeas do grupo ETOH50 apresentaram comportamento menos ansioso quando comparados aos animais dos grupos SALINA e ETOH25. Este resultado contrasta com muitos estudos que suportam a ideia que aumentos persistentes do comportamento ansioso em machos e fêmeas após a exposição fetal ao etanol, mensurado tanto pelo labirinto em cruz elevado quanto pelo tempo gasto em um novo *open field* iluminado (Cullen *et al.*, 2013; Dursun *et al.*, 2006; Kleiber *et al.*, 2011). Esta discrepância pode estar associada ao momento em que ocorre a exposição ao etanol. Enquanto na maioria dos estudos que apontam um efeito ansiogênico do etanol em roedores a exposição se dá durante o período gestacional, quando a exposição envolve apenas o período neonatal se observa um efeito ansiolítico (Marquardt e Brigman, 2016).

O desenvolvimento neural de mamíferos pode ser dividido em seis etapas distintas: gênese neural, migração, proliferação glial, proliferação de axônios/dendritos, sinaptogênese, morte celular e mielinização (West, 1987). As fases de desenvolvimento entre as espécies são equacionados usando esses processos. Para os humanos, o primeiro corresponde a gastrulação, o segundo a proliferação e migração e o terceiro, ao surto de crescimento e diferenciação cerebral. O refinamento e a mielinização ocorrem após o nascimento e durante o desenvolvimento. Para facilitar comparações entre estudos e espécies, os experimentos citados e discutidos serão caracterizados pelos pontos de tempo equivalentes em dias gestacionais de roedores (GD) ou dias pós-natais (PN). Dessa forma, as janelas de exposição serão equivalente à: primeiro trimestre (DG 1 a 10), segundo trimestre (DG 11 a 21) e terceiro trimestre (PN1 a PN12). O terceiro trimestre apresenta desafios únicos ao campo de exposição

fetal ao álcool, como ocorre no período pós-natal. A maior diferença é que os filhotes são expostos diretamente ao álcool e não a metabólitos de primeira passagem, como ocorreria durante a exposição gestacional. Mesmo com essa diferença, o período equivalente ao terceiro trimestre não pode ser descontado em modelos de roedores porque as mães humanas continuam a ingerir álcool durante esse período de tempo de desenvolvimento. (Ethen *et al.*, 2009)

Desta forma, os efeitos específicos devem, portanto, serem vistos com base no momento do insulto à exposição fetal ao etanol. Por exemplo, a exposição durante a proliferação resultaria em um número anormal de neurônios, a exposição durante a migração resultaria em posicionamento diferencial, enquanto a axogênese interrompida resultaria em sinapses aberrantes e possivelmente sinalização diferencial. No entanto, a maioria dos modelos EPA (exposição pré-natal ao álcool) abrangem vários dias, ou semanas, de desenvolvimento quando múltiplos processos de desenvolvimento estão ocorrendo simultaneamente. Isso significa que vários circuitos e regiões podem ser afetados por um único modelo.

Além disso, é possível que diferenças com relação ao nível de estresse produzido pelo ambiente de teste também contribuam para as discrepâncias entre os resultados do LCE obtidos no nosso estudo e os que apontam um efeito ansiogênico da exposição precoce ao etanol. Curiosamente, pode ser que exposições moderadas não sejam suficientes para causar alterações de ansiedade que são mensuráveis no LCE (Barbaccia *et al.*, 2007), tornam-se evidentes em paradigmas mais estressantes, como o cruzamento de lacunas (Wellmann *et al.*, 2015). Assim como em outros testes, resultados contrários foram encontrados, como a diminuição da ansiedade no labirinto zero usando uma exposição moderada no segundo e terceiro trimestres (Cagiano *et al.*, 2002). Diferenças nos paradigmas utilizados para testar a ansiedade, como o comportamento, podem contribuir para essas discrepâncias. O labirinto zero elimina o quadrado central ambíguo do labirinto em cruz e poderia aumentar a locomoção, o que poderia consequentemente esconder alterações na ansiedade, a menos que existissem condições mais estressantes. De acordo com essa hipótese, o estresse exacerba comportamentos semelhantes aos da ansiedade em camundongos expostos ao etanol (Hannigan *et al.*, 1987; Hellemans, *et al.*, 2008; Osborn *et al.*, 1998; Staples *et al.*, 2013). No entanto, um estudo realizado durante o primeiro e segundo trimestres de gestação, a prole de camundongos, utilizando somente os machos, não mostrou alteração no tempo de centro no campo aberto após serem submetidos a um estresse de restrição considerado leve (Popova *et*

*al.*, 2011). Isso sugere que o estresse pode precisar atingir um limiar mínimo antes de exacerbar os déficits causados pela exposição precoce ao etanol.

#### **4.6 A exposição ao etanol afetou o comportamento na esquiiva passiva**

No teste de esquiiva passiva, a exposição ao etanol comprometeu o comportamento dos animais de modo sexo dependente. Na sessão realizada 3h após a primeira sessão os machos expostos à ambas as doses de etanol apresentaram menores latências de descida da plataforma e menores diferenças entre a primeira e a segunda sessão que os machos injetados com salina. Na sessão realizada 24h após o primeiro teste, somente os machos do grupo ETOH50 apresentaram valores menores que os machos do grupo salina.

Assim como nos estudos relacionados aos efeitos da ansiedade em roedores citados anteriormente, em tarefas de desempenho de memória, existem na literatura muitos indícios que as fêmeas possuem desempenho diferenciado dos machos, podendo ser pior, ou melhor, dependendo de qual tipo de memória que é avaliada, a forma como é avaliada e a idade em que ocorre a avaliação (Jonasson, 2005). As fêmeas podem ter um melhor desempenho em tarefas que avaliam a memória e aprendizado de acordo com a fase do ciclo estral que se encontram quando comparadas aos machos (Diaz-Veliz *et al.*, 1989; Warren e Juraska, 1997; Júnior e Morato, 2002). Isso aconteceria devido às flutuações hormonais endógenas, que são resultados de estudos que medem explicitamente a aprendizagem espacial ao longo do ciclo estral. Warren e Juraska encontraram desempenho superior durante a fase de estro (Daniel *et al.*, 1997), mas pelo menos três outros laboratórios não conseguiram encontrar diferenças de desempenho ao longo do ciclo estral (Bucci *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 1997; Cimadevilla *et al.*, 2000). Porém, nossos testes foram realizados no início da puberdade de camundongos, em PN30, e eles só alcançam a maturidade reprodutiva entre 7-9 semanas de vida (Chorilli *et al.*, 2007) logo, é pouco provável que essa possibilidade se aplique aos resultados que encontramos.

Outra possibilidade poderia estar relacionada aos efeitos diferenciados em machos e fêmeas da exposição precoce ao etanol no hipocampo e na plasticidade neural (Fontaine *et al.*, 2016). De modo geral, os distúrbios de memória e aprendizado decorrentes da exposição ao etanol durante o desenvolvimento são associados com o aumento da apoptose e a redução na plasticidade no hipocampo (Ikonomidou *et al.*, 2000; O'malley e Nanson, 2002; Medina,

2011). Em acordo com esta ideia, o hipocampo parece ser particularmente sensível a apoptose induzida tanto pelo bloqueio dos receptores NMDA como pela hiperativação do GABAA (Bittigau *et al.*, 2003; Livy *et al.*, 2003; Nunez e Mccarthy, 2004; Sinner *et al.*, 2011). A morte causada pela exposição ao etanol no período equivalente ao terceiro trimestre da gestação na zona subgranular do giro dentado reduz o acervo de células tronco/progenitoras e diminui a capacidade do hipocampo promover a neurogênese adulta (Ieraci e Herrera, 2007). Recentemente, tem sido sugerido que a neurogênese hipocampal desempenha um papel importante no aprendizado e memória especialmente na organização temporal dos eventos aprendidos (Deng *et al.*, 2010). Contudo, a redução na população de células pós-sinápticas que apresentam receptores do tipo NMDA e/ou GABAA pode desempenhar um papel fundamental nos distúrbios de aprendizado e memória observados em nosso estudo. De modo interessante, a exposição precoce ao etanol tem mostrado reduzir a sobrevivência das células do hipocampo em machos (Sliwowska *et al.*, 2012), mas não nas fêmeas (Ubanet al., 2010). Adicionalmente, a exposição neonatal pode levar ao aumento do nível de estrogênio basal (He *et al.*, 2012), o que pode levar implicações na plasticidade sináptica, por esse motivo, é interessante considerar ambos os sexos em estudos futuros.

O receptor NMDA está intimamente ligado com as duas principais formas de plasticidade na transmissão sináptica: a potenciação de longo termo (LTP, *long term potentiation*) e a depressão de longo termo (LTD, *long term depression*) que são caracterizadas, respectivamente, por um aumento ou uma diminuição na intensidade da resposta pós-sináptica (Barco *et al.*, 2008; Collingridge *et al.*, 2010). Vale mencionar que tanto o LTP como o LTD, induzidos pela ativação dos receptores NMDA, tem se mostrado essenciais nos processos de diversos tipos de aprendizado e memória (Barco *et al.*, 2008; Collingridge *et al.*, 2010). De modo importante, a ação inibitória dos receptores GABAA durante a puberdade reduz a ativação dos receptores NMDA e dificulta a formação do LTP em neurônios do hipocampo (Shen *et al.*, 2010). Contudo, ao invés de melhorar o aprendizado e memória como se poderia supor a princípio, a redução no número dos receptores GABAA no hipocampo prejudica o aprendizado e memória (Prut *et al.*, 2010). A ativação dos receptores GABAA também tem se mostrado capaz de promover o LTD no hipocampo de ratos pré-púberes (Akhondzadeh e Stone, 1998). Desta forma, podemos supor que o maior aumento da morte neuronal nos machos durante o período de surto de crescimento cerebral dos neurônios que expressam receptores NMDA e GABAA comprometeria de modo significativo a capacidade do hipocampo gerar LTP e LTD, o que por sua vez, levaria aos maiores déficits de aprendizado e memória observados nos machos. Apesar de um estudo em

ratos mostrando que a exposição gestacional ao etanol promove uma redução do LTP no CA1 de machos e uma facilitação em fêmeas (An e Zhang, 2013), outros estudos não observaram tal diferença ou observaram redução nos dois sexos (Fontaine *et al.*, 2016).

No giro denteado (GD), existe uma imagem mais consistente dos efeitos da exposição neonatal ao etanol na LTP. Geralmente, na prole masculina, a LTP é reduzida na maturidade, enquanto que nas fêmeas há relatos de ausência de efeito da exposição neonatal ou de facilitação da LTP (Fontaine *et al.* 2016). Os efeitos da exposição precoce na plasticidade do GD também parecem depender do tempo de administração do álcool. Quando o álcool foi administrado no 1º, 2º ou 3º trimestres, a LTP *in vitro* foi prejudicada nos machos somente após o 2º trimestre de exposição (Helfferet *et al.*, 2012) e não foi prejudicada em nenhum grupo de exposição *in vivo*. Curiosamente, a LTP foi facilitada em fêmeas após a exposição equivalente no 3º trimestre apenas. Também foi observado a facilitação da LTP no GD em ratos adolescentes fêmeas (PN 30-35) *in vivo* (Titterness and Christie, 2012), mas em adultos (PN 55-70) (Patten *et al.*, 2013a; Patten *et al.*, 2013b; Sickmann *et al.*, 2014) após dois trimestres de exposição ao álcool (6.6% v/v), indicando que pode haver mecanismos compensatórios que capazes de restaurar a LTP normal na idade adulta quando a exposição neonatal é restrita à fêmeas, enquanto que em machos, o prejuízo a LTP no GD pode persistir até a vida adulta.

Além disso, o teste de esquiva passiva busca avaliar a memória episódica ou memória emocional, especificamente nesse teste, forma a memória relacionada ao medo. Em tarefas de estímulo condicionado ao medo, o animal aprende a fazer a associação ao estímulo incondicionado (ex: choque nas patas quando é posto em um determinado ambiente). Muitos estudos já mostraram que a amígdala é uma área do cérebro chave para aprender o medo (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1999; Fanselow e Ledoux, 1999; Ledoux, 2000; Wilensky *et al.*, 2006), para formar e expressar esse tipo de memória, assim como o hipocampo (Phillips e Ledoux, 1992; Myers e Gluck, 1994). Os déficits causados pelo etanol na síntese proteica dessas áreas podem provocar o bloqueio da consolidação desse tipo de memória e conseqüentemente fazendo com que os animais expostos a maior dose tenham um mau desempenho na esquiva passiva. Contudo, se a exposição ao etanol no período neonatal afeta de modo dependente do sexo a amígdala de roedores é uma questão que ainda permanece por ser investigada.

#### **4.7 A exposição ao etanol aumentou a atividade natatória e a lateralidade rotacional no teste de nado livre**

Como indicado em estudos anteriores (Filgueiras and Manhães, 2004; 2005; Manhães et al., 2007; Schmidt et al., 1999), independente do tratamento pós-natal, houve o aumento da atividade rotacional total na primeira sessão de teste no nado forçado e, provavelmente, esse resultado seria devido ao comportamento de fuga do ambiente estressor. De fato, quando o animal é colocado pela primeira vez em uma arena aquática estressante, seu comportamento é caracterizado por natação ativa acompanhado de frenéticos arranhões nas laterais da câmara de teste (Krahe et al., 2001; Schmidt et al., 1999). Estratégias comportamentais que diminuem o gasto de energia, como flutuação passiva ou natação lenta, são interpretadas como formas de estratégias de enfrentamento ao estresse no nado forçado (de Kloet and Molendijk, 2016). Neste sentido, O teste de natação forçada de roedores pode ser um valioso modelo animal para explorar os mecanismos neurobiológicos responsáveis pela seleção de respostas ativas e passivas a estressores inescapáveis.

Tem sido proposto que a mudança de estratégias de enfrentamento ativo para passivo seja uma resposta aprendida adaptativa que depende da ativação do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (Cabib e Puglisi-Allegra, 2012; Kloet e Molendijk, 2016). Particularmente, altos níveis de ativação de dopamina suportam a execução de respostas defensivas dispendiosas e arriscadas que caracterizam estratégias ativas de enfrentamento, enquanto que níveis reduzidos de dopamina bloqueiam essas respostas (Tye *et al.*, 2013; Cabib e Puglisi-Allegra, 2012; Kloet e Molendijk, 2016). Tye e colaboradores (2013) demonstraram que a ativação de dopamina nos neurônios do VTA aumenta o comportamento de fuga durante o nado forçado, mas não a deambulação em campo aberto. Portanto, uma explicação plausível para o aumento da atividade natatória observada em camundongos expostos ao etanol é que ela reflete uma estratégia de enfrentamento mal-adaptativa contra uma situação de teste inescapável causada por um sistema dopaminérgico mesocorticolímbico hiperativo. Além disso, é importante notar que a capacidade de resposta dos circuitos dopaminérgicos mesolímbico-cortical durante situações aversivas depende de entradas do hipocampo ventral e amígdala (Kloet e Molendijk, 2016), que são regiões alvos de hormônios corticosteroides liberados sob estresse (Mcklveen *et al.*, 2013; Myers *et al.*, 2014; de Kloet and Molendijk, 2016). Assim, a hiperatividade natatória de animais expostos ao etanol no teste de nado forçado também pode estar associada a efeitos tóxicos do álcool na função do

eixo HPA (Virgolini *et al.*, 2005; Virgolini *et al.*, 2006; White *et al.*, 2007). Estudos futuros são necessários para examinar o papel do sistema mesolímbico nas estratégias de enfrentamento relacionadas ao estresse da toxicidade do etanol.

#### **4.8 A exposição ao etanol aumentou a lateralidade rotacional no teste de nado livre.**

Além da maior atividade natatória, os camundongos expostos ao etanol na dose mais alta (ETOH50) foram mais lateralizados quando comparados aos grupos salina e ETOH25. Este resultado está de acordo com um estudo prévio realizado por nosso grupo em camundongos (Filgueiras *et al.*, 2009) com estudos em humanos que mostram que a exposição ao álcool durante a gravidez afeta o padrão de assimetria cerebral (Riikonen *et al.*, 1999; Riley *et al.*, 2004; Niccols, 2007; Sowell *et al.*, 2008). Apesar de não termos avaliado a bioquímica nem a morfologia da assimetria cerebral, vários autores já sugeriram que essas alterações refletem assimetrias dopaminérgicas no sistema nigroestriatal (Glick e Shapiro, 1985; Carlson e Glick, 1996b; Schwarting e Huston, 1996; Nielsen *et al.*, 1997). É importante mencionar que vários estudos mostraram que tanto as assimetrias estriatais como rotacionais são moduladas pelo córtex pré-frontal (Glick e Greenstein, 1973; Carlson e Glick, 1996a; Nielsen *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 2006) e tanto o córtex pré-frontal quanto os gânglios da base, que são estruturas fundamentais envolvidas no aspecto cognitivo do movimento (planejar e executar), são afetados pela exposição precoce ao etanol (Barr *et al.*, 2005; Kumral *et al.*, 2005; Cortese *et al.*, 2006; Fryer *et al.*, 2007; Niccols, 2007). Portanto, nossos dados sugerem que, pelo menos em camundongos, a exposição ao etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre de gestação humana induz um aumento nas assimetrias dopaminérgicas.

O aumento da assimetria rotacional pode ainda estar associado ao efeito da exposição precoce ao etanol sobre o desenvolvimento do corpo caloso. O corpo caloso é um grande trato da substância branca que conecta os dois hemisférios cerebrais e facilita a interação inter-hemisférica efetiva. Uma série de estudos vem demonstrando que a exposição precoce ao etanol é capaz de reduzir o corpo caloso tanto em roedores (Wainwright e Gagnon, 1985; Moreland *et al.*, 2002) com em humanos (Jacobson *et al.*, 2017; Biffen *et al.*, 2018). De modo interessante, alguns estudos sugerem uma relação inversa entre o tamanho/conectividade do corpo caloso e a magnitude de assimetrias inter-hemisféricas morfológicas e comportamentais (Rosen *et al.*, 1989; Aboitiz *et al.*, 1992; Filgueiras e Manhães, 2004; 2005)

#### 4.9 A exposição ao etanol não afetou os níveis de estresse oxidativo no córtex

A despeito da ideia geral de que a exposição precoce ao etanol aumenta os níveis de estresse oxidativo no tecido nervoso (Cohen-Kerem e Koren, 2003; Amin *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2016), nossos dados indicaram que a exposição precoce ao etanol não afetou nenhum dos biomarcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo. Esta discrepância pode estar relacionada ao fato de que o estresse oxidativo promovido pela exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral depende da região, da idade e do intervalo entre a exposição e a análise dos biomarcadores (Brocardo *et al.*, 2011a). Em estruturas como o hipocampo, o aumento do estresse oxidativo causado pela exposição neonatal ao etanol pode ser observado por pelo menos 50 dias após a exposição (Brocardo *et al.* 2017). Em contraste, no córtex cerebral e no estriado é possível observar um claro aumento do estresse oxidativo 2h após a administração de etanol em PN7, mas não entre 10 e 12h após a exposição (Heaton, Paiva, Madorsky, Mayer, *et al.*, 2003; Heaton, Paiva, Madorsky e Shaw, 2003).

#### 4.10 A exposição à cafeína reduziu os níveis de estresse oxidativo e promoveu uma leve diminuição dos efeitos comportamentais da exposição neonatal etanol

Neste estudo avaliamos os níveis de estresse oxidativo em PN9 e PN30, pela avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbutúrico (TBARS), da capacidade antioxidante (DPPH) e das proteínas carboniladas. Em acordo com a literatura, na maioria dos casos, foi possível verificar que a cafeína foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo. Embora em PN9, os animais ainda estivessem sendo expostos a cafeína, em PN30 já estavam a pelo menos 9 dias sem contato com esta droga. Desta forma, os efeitos da cafeína sobre os níveis de estresse oxidativo parecem ser mais duradouros que os do etanol.

Os animais do grupo CAF3 mostraram melhor capacidade antioxidante em relação aos demais segundo o ensaio DPPH, enquanto que os dois grupos expostos a cafeína (CAF1 e CAF3) apresentaram valores menores de proteínas carboniladas. Esses dados corroboram outros estudos com roedores neonatos que apontam a cafeína como uma substância neuromoduladora com importantes propriedades anti-inflamatórias, antiapoptóticas e antioxidante (Weichelt *et al.*, 2013; Endesfelder *et al.*, 2017). A única inconsistência com

relação ao efeito antioxidante da cafeína foi observada para o ensaio de TBARS. Enquanto em PN9, os resultados sugerem redução na peroxidação lipídica no córtex através da marcação com MDA, em PN30 os maiores níveis de MDA observados no grupo CAF3 sugerem um aumento na peroxidação lipídica. A princípio, este resultado poderia sugerir que a suspensão da cafeína, após um longo período de exposição induz um aumento nos níveis de estresse oxidativo. Contudo, devemos considerar este resultado com alguma cautela, uma vez que os demais indicadores de estresse oxidativo sugerem um resultado oposto em PN30. Além disso, apesar do MDA ser considerado e amplamente utilizado como um biomarcador indicativo de desequilíbrio da atividade oxidativa do organismo, é necessário considerar que nem todo processo de peroxidação lipídica tem o MDA como subproduto, assim como nem todo MDA encontrado em amostras biológicas é proveniente da oxidação celular (Janero, 1990; França *et al.*, 2013). E por esse motivo, vários processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento neural podem ter influenciado essa diferença entre as idades analisadas.

Considerando que uma parte dos efeitos neurocomportamentais da exposição precoce ao etanol pode estar associada ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) via ativação/indução de NADPH oxidases (NOX), bioativação de substâncias intermediárias formadoras de radicais livres, dentre outros mecanismos (Wells *et al.*, 2016), era esperado que a exposição a cafeína tivesse algum papel protetor na manifestação dos distúrbios neurocomportamentais induzidos pela exposição ao etanol. Esta suposição se baseia em uma série de estudos que apontam que o tratamento com agentes antioxidantes durante a exposição ao etanol é capaz de mitigar uma série de distúrbios observados na FASD (Brocardo *et al.*, 2011b; Ojeda *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). De modo interessante, apesar de não observarmos interações estatisticamente significativas entre a exposição a cafeína e ao etanol neste estudo, os efeitos neurocomportamentais da exposição ao etanol no LCE e no teste de nado livre foram atenuados pela exposição a cafeína. Isto ficou evidente quando o efeito do etanol foi avaliado separadamente nos grupos de animais expostos a cada uma das soluções de cafeína e a água potável. Não foi possível identificar no grupo de animais exposto a maior dose de cafeína o efeito ansiolítico no etanol no LCE nem o aumento da atividade natatória e da magnitude da lateralidade no teste de nado livre. Efeito semelhante da cafeína já havia sido descrito por nosso grupo com relação a hiperatividade locomotora induzida pela exposição ao etanol no teste de campo aberto.

O efeito protetor da cafeína na manifestação dos déficits neurocomportamentais da FASD pode estar associado ainda a um aumento da plasticidade neural causado por esta substância. A adenosina é um importante neuromodulador associado à neuroplasticidade em

diferentes regiões do SNC (Mendonça e Ribeiro, 1997; D'alcantara *et al.*, 2001) e os alvos moleculares principais da cafeína são os receptores adenosinérgicos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. Através do bloqueio do A<sub>1</sub> e facilitação do A<sub>2A</sub>. Kaster *et al.*, (2015) afirma que o consumo de cafeína se correlaciona inversamente com a depressão e a deterioração da memória, e atribui ao receptor A<sub>2A</sub> o principal alvo terapêutico porque controlam plasticidade sináptica e proporcionam neuroproteção. Além da cafeína ter sua principal ação como antagonista dos receptores de adenosina, no SNC, ela também possui a capacidade de inibir a atividade das fosfodiesterases promovendo aumento nos níveis de AMPc e GMPc (Wells e Kramer, 1981; Beavo e Reifsnnyder, 1990; Shi *et al.*, 2003; Corsetti *et al.*, 2007), facilitação da liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Ehrlich, 1995) e bloqueio dos receptores GABA<sub>A</sub> (Akopian *et al.*, 1998). Desta forma é possível que a exposição à cafeína durante o período do desenvolvimento utilizado neste estudo tenha evitado a redução dos níveis de AMPc e/ou GMPc causados pela exposição ao etanol. Alternativamente, é possível especular que a administração de cafeína possibilitou, via inibição da fosfodiesterase, um aumento da neuroplasticidade e, portanto, uma maior capacidade de recuperação comportamental nos animais expostos ao etanol.

## CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo principal testar a hipótese que a exposição à cafeína minimiza as alterações neurocomportamentais induzidas pela exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral.

A exposição ao etanol durante o surto de crescimento cerebral foi capaz afetar o comportamento dos camundongos na adolescência. Particularmente, quando comparados aos animais expostos a solução salina, os animais expostos ao etanol apresentaram menores níveis de ansiedade, prejuízos de aprendizado e memória e maior atividade natatória e um aumento na magnitude da lateralidade rotacional.

A exposição cafeína do primeiro dia gestacional até o 21º dia pós-natal não afetou o comportamento dos camundongos na adolescência. De modo interessante, no grupo de animais expostos a maior dose de cafeína não foi possível identificar o efeito ansiolítico do etanol nem o aumento da atividade natatória e da magnitude da lateralidade no teste de nado livre causado pelo etanol.

Enquanto a exposição precoce ao etanol não afetou os níveis de estresse oxidativo, a cafeína foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo na maioria dos biomarcadores utilizados neste estudo.

Tomados em conjunto nossos dados suportam a hipótese que a exposição a cafeína é capaz de mitigar as alterações neurocomportamentais induzidas pela exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral. Além disso, o efeito protetor da cafeína está associado à sua capacidade antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, E. In utero alcohol exposure and developmental delay of response inhibition. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 6, p. 369-376, 1982.
- ABOITIZ, F.; SCHEIBEL, A.; ZAIDEL, E. Morphometry of the Sylvian fissure and the corpus callosum, with emphasis on sex differences. *Brain* v. 115, p. 1521–1541, 1992.
- ACHESON SK, ROSS EL, SWARTZWELDER HS. Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. *Alcohol* 23: 167-175, 2001.
- AKHONDZADEH, S.; STONE, T. Potentiation of muscimol-induced long-term depression by benzodiazepines and prevention or reversal by pregnenolone sulfate. *Pharmacol Res*, v. 38, p. 441-448, 1998.
- AKOPIAN, A.; GABRIEL, R.; WITKOVSKY, P. Calcium released from intracellular stores inhibits GABAA-mediated currents in ganglion cells of the turtle retina. *J Neurophysiol.*, v. 80, p. 1105-1115, 1998.
- ALBS, B.; JM, D.; JP, D. Estresse Oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa dos organismos. *Química Nova* v. 29, p. 113-123, 2006.
- ALVAREZ, J.; EMORY, E. Executive function and the frontal lobes: a meta-analytic review. *Neuropsychol Rev*, v. 16, p. 17-42, 2006.
- AMBROGI-LORENZINI, C. et al. Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem*, v. 71, p. 1-18, 1999.
- AMIN, F.; SHAH, S.; KIM, M. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. *Neurochem Int.* , v. 96, p. 1-12, 2016.
- AN, L.; ZHANG, T. Spatial cognition and sexually dimorphic synaptic plasticity balance impairment in rats with chronic prenatal ethanol exposure. *Behav. Brain*, v. 256, p. 564–574, 2913.
- ARAGON, A. et al. Neuropsychological study of FASD in a sample of American Indian children: processing simple versus complex information. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 32, p. 2136-2148, 2008.
- BALACHOVA T, BONNER B, CHAFFIN M, BARD D, ISURINA G, TSVETKOVA L, VOLKOVA E. Women's alcohol consumption and risk for alcohol-exposed pregnancies in Russia. *Addiction* 107: 109-117, 2012.
- BANDEIRA F, LENT R, HERCULANO-HOUZEL S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106: 14108-14113, 18-8-2009.

BARBOSA, K. B. F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARCO, A.; LOPEZ, A. D.; ALARCON, J. Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, v. 32, p. 831-851, 2008.

BARR, A. et al. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 29, p. 1915-1920, 2005.

BARR, H.; STREISSGUTH, A. Caffeine use during pregnancy and child outcome: a 7-year prospective study. *Neurotoxicol Teratol*, v. 13, p. 441-448, 1991.

BEAVO, J.; REIFSNYDER, D. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 11, p. 150-155, 1990.

BECKER HC, AZ-GRANADOS JL, RANDALL CL. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 55: 501-513, 1996.

BEKKHUS, M. et al. Intrauterine exposure to caffeine and inattention/overactivity in children. *Acta Paediatr*, v. 99, p. 925-928, 2010.

BENEDUM CM, YAZDY MM, MITCHELL AA, WERLER MM. Risk of spina bifida and maternal cigarette, alcohol, and coffee use during the first month of pregnancy. *Int.J.Environ.Res.Public Health* 10: 3263-3281, 2013.

BENOWITZ, N. et al. Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clin Pharmacol Ther*, v. 58, p. 684-691, 1995.

BERRY, B.; MCMAHON, R.; GALLAGHER, M. Spatial learning and memory at defined points of the estrus cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behav Neurosci*, v. 111, p. 167-174, 1997.

BHATARA V, LOUDENBERG R, ELLIS R. Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J Atten.Disord.* 9: 515-522, 2006.

BIEBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, v. 5, p. 9-19, 2012.

BIERBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, v. 5, p. 9-19, 2012.

BIFFEN, S. et al. Reductions in Corpus Callosum Volume Partially Mediate Effects of Prenatal Alcohol Exposure on IQ. *Front Neuroanat*, v. 11, p. 132, 2018.

BITTENCOURT, S. C.; CAPONI, S.; MALUF, S. Pharmacology in the twentieth century: the science of drugs through the analysis of Goodman and Gilman's textbook. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 20, n. 2, p. 499-520, 2013. ISSN 0104-5970.

BITTIGAU, P.; SIFRINGER, M.; IKONOMIDOU, C. Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, v. 993, p. 103-114, 2003.

BOEHM, S. N. et al. Using drinking in the dark to model prenatal binge-like exposure to ethanol in C57BL/6J mice. *Dev Psychobiol*, v. 50, p. 566-578, 2008.

BONITA, J. et al. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *PHARMACOLOGICAL RESEARCH*, v. 55, p. 187-198, 2007.

BRACHA, H. et al. Rotational movement (circling) in normal humans: sex difference and relationship to hand, foot and eye preference. . *Brain Res*, v. 411, p. 231-235, 1987.

BRAZEL CY, ROMANKO MJ, ROTHSTEIN RP, LEVISON SW. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog.Neurobiol*. 69: 49-69, 2003.

BROCARDO PS, GIL-MOHAPEL J, CHRISTIE BR. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Res.Rev*. 67: 209-225, 24-6-2011.

BUCCI, D.; CHIBA, A.; GALLAGHER, M. Spatial learning in male and female long-evans rats. *Behav Neurosci*, v. 109, p. 180-183, 1995.

BUEGE, J.; AUST, S. . Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, v. 8, p. 155–159, 1978.

BURD L, KLUG MG, MARTSOLF JT, KERBESHIAN J. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicol.Teratol*. 25: 697-705, 2003.

CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 36, p. 79-89, 2012.

CARLSON, J.; GLICK, S. Circling behavior in rodents. In: SANDBERG, P. (Ed.). *Motor activity and movement disorders: research issues and applications*. New Jersey: Humana Press, 1996a. p.269-300.

CARNEIRO, L. et al. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. *Neurotoxicol Teratol*, v. 27, p. 585-592, 2005.

CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci.Biobehav.Rev*. 29: 1193-1205, 2005.

CARTWRIGHT MM, SMITH SM. Stage-dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin.Exp.Res*. 19: 1454-1462, 1995.

CASTAGNE V, MOSER P, ROUX S, PORSOLT RD. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr.Protoc.Neurosci*. Chapter 8: Unit-2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION-CDC. Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age - United States, 1991–2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58: 529-532, 2009.

CHOI IY, ALLAN AM, CUNNINGHAM LA. Moderate fetal alcohol exposure impairs the neurogenic response to an enriched environment in adult mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 29: 2053-2062, 2005.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.; SALGADO, H. Animais de laboratório: o camundongo. . *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p. 11-23, 2007.

CHOU, T. Wake up and smell the coffe. Caffeine, coffe and the medical consequences. *West J Med*, v. 157, p. 544-553, 1992.

CHRISTIAN MS, BRENT RL. Teratogen update: evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Teratology* 64: 51-78, 2001.

CIMADEVILLA, J.; FENTON, A.; BURES, J. Continuous place avoidance task reveals differences in spatial navigation in male and female rats. *Behav Brain Res*, v. 107, p. 161-169, 2000.

COHEN-KEREM, R.; KOREN, G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol.Teratol.*, v. 25, p. 1-9, 2003.

COLLINGRIDGE, G. et al. Long-term depression in the CNS. *Nat.Rev.Neurosci.* , v. 11, p. 459-473, 2010.

COLLINS, M.; NEAFSEY, E. Ethanol and adult CNS neurodamage: oxidative stress, but possibly not excitotoxicity. *Front Biosci (Elite Ed)*, v. 4, p. 1358-1367, 2012.

CONNOR, P. et al. Direct and indirect effects of prenatal alcohol damage on executive function. *Dev Neuropsychol*, v. 18, p. 331-354, 2000.

CORSETTI, G. et al. Acute caffeine administration decreased NOS and Bcl2 expression in rat skeletal muscles. *Pharmacol.Res.*, v. 55, p. 96-103, 2007.

CORTESE, B. et al. Magnetic resonance and spectroscopic imaging in prenatal alcohol-exposed children: preliminary findings in the caudate nucleus. *Neurotoxicol Teratol*, v. 28, p. 597-606, 2006.

CROZIER SR, ROBINSON SM, BORLAND SE, GODFREY KM, COOPER C, INSKIP HM. Do women change their health behaviours in pregnancy? Findings from the Southampton Women's Survey. *Paediatr.Perinat.Epidemiol.* 23: 446-453, 2009.

CRUZ, A.; FREI, F.; GRAEFF, F. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 49, p. 171-176, 1994.

CUDD, T. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 230, p. 389-393, 2005.

- CULLEN, C. et al. Low dose prenatal ethanol exposure induces anxietylike behaviour and alters dendritic morphology in the basolateral amygdala of rat offspring. *PLoS One*, v. 8, p. e54924, 2013.
- CUNHA, R. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int*, v. 38, 2001.
- D'ALCANTARA, P. et al. Inactivation of adenosine A2A receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience*, v. 107, p. 455–464, 2001.
- DANIEL, J. et al. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav*, v. 32, p. 217-225, 1997.
- DENARO, C. et al. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clin Pharmacol Ther*, v. 48, p. 277-285, 1990.
- DENG, W.; AIMONE, J.; GAGE, F. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 11, p. 339-350, 2010.
- DIAZ, M. et al. Moderate Alcohol Exposure during the Rat Equivalent to the Third Trimester of Human Pregnancy Alters Regulation of GABAA Receptor-Mediated Synaptic Transmission by Dopamine in the Basolateral Amygdala. *Front Pediatr*, v. 2, p. 46, 2014.
- DIAZ-VELIZ, G. et al. Influences of the Estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement upon the acquisition of conditioned avoidance responses in rats. *Physiology and Behavior*, v. 46, p. 397-401, 1989.
- DOBBING J, SANDS J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum.Dev.* 3: 79-83, 1979.
- DOIG J, MCLENNAN JD, GIBBARD WB. Medication effects on symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in children with fetal alcohol spectrum disorder. *J Child Adolesc.Psychopharmacol.* 18: 365-371, 2008.
- DOPICO AM, LOVINGER DM. Acute alcohol action and desensitization of ligand-gated ion channels. *Pharmacol Rev.* 61: 98-114, 2009.
- DURSUN, I.; JAKUBOWSKA-DOGRU, E.; UZBAY, T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 85, p. 345-355, 2006.
- ECKARDT MJ, FILE SE, GESSA GL, GRANT KA, GUERRI C, HOFFMAN PL, KALANT H, KOOB GF, LI TK, TABAKOFF B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 22: 998-1040, 1998.
- EHRlich, B. Functional properties of intracellular calcium-release channels. *Curr Opin Neurobiol.* , v. 5, p. 304-309, 1995.

ENDESFELDER, S.; WEICHEL, U.; SCHILLER, C. Caffeine Protects Against Anticonvulsant-Induced Neurotoxicity in the Developing Rat Brain. *Neurotox Res*, v. 32, p. 460-472, 2017.

ENDESFELDER, S.; WEICHEL, U.; STRAUSS, E. Neuroprotection by caffeine in hyperoxia-induced neonatal brain injury. *Int J Mol Sci*, v. 18, p. 187, 2017.

ETHEN, M. et al. Alcohol consumption by women before and during pregnancy. *Matern Child Health J*, v. 13, p. 274-285, 2009.

FANSELOW, M.; LEDOUX, J. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, v. 23, p. 229-232, 1999.

FENTON, H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc*, v. 65, p. 899-910, 1984.

FILGUEIRAS CC, CARVALHO-SILVA A CC, SKINNER GO, MANHÃES AC, ABREU-VILLAÇA Y. Caffeine mitigates locomotor hyperactivity induced by neonatal ethanol exposure in mice. *RSOA*, 2015.

FILGUEIRAS CC, KRAHE TE, MEDINA AE. Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. *Neurosci.Lett.* 473: 202-207, 26-2-2010.

FILGUEIRAS CC, RIBEIRO-CARVALHO A, NUNES F, ABREU-VILLAÇA Y, MANHÃES AC. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 93: 148-154, 2009.

FILGUEIRAS, C. et al. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 93, p. 148-154, 2009.

FILGUEIRAS, C. et al. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. *Behav Brain Res*, v. 172, p. 33-38, 2006.

FILGUEIRAS, C.; KRAHE, T.; MEDINA, A. Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. *Neurosci Lett.* , v. 473, p. 202-207, 2010.

FILGUEIRAS, C.; MANHÃES, A. Effects of callosal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. *Behav Brain Res*, v. 155, p. 13-25, 2004.

FILGUEIRAS, C.; MANHÃES, A. Increased lateralization in rotational side preference in male mice rendered acallosal by prenatal gamma irradiation. *Behav Brain Res*, v. 162, p. 289-298, 2005.

FITTING S, IGNATOWSKA-JANKOWSKA BM, BULL C, SKOFF RP, LICHTMAN AH, WISE LE, FOX MA, SU J, MEDINA AE, KRAHE TE, KNAPP PE, GUIDO W, HAUSER KF. Synaptic dysfunction in the hippocampus accompanies learning and memory deficits in human immunodeficiency virus type-1 Tat transgenic mice. *Biol.Psychiatry* 73: 443-453, 1-3-2013.

FONTAINE, C. et al. Effects of pre-natal alcohol exposure on hippocampal synaptic plasticity: Sex, age and methodological considerations. *Neurosci Biobehav Rev*, p. 12-34, 2016.

FRANÇA, B. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE Jornal Português de Gastreenterologia*, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FRARY CD, JOHNSON RK, WANG MQ. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J.Am.Diet.Assoc.* 105: 110-113, 2005.

FREDHOLM, B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*, v. 51, p. 83-133, 1999.

FREDHOLM, B. et al. Adenosine and brain function. *TInt Rev Neurobiol*, v. 63, p. 191-270, 2005.

FRYER SL, MCGEE CL, MATT GE, RILEY EP, MATTSON SN. Evaluation of psychopathological conditions in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Pediatrics* 119: e733-e741, 2007.

FRYER, S. et al. Prenatal alcohol exposure affects frontal–striatal BOLD response during inhibitory control. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 31, p. 1415-1424, 2007.

GABRIEL, K. et al. Prenatal ethanol exposure alters sensitivity to the effects of corticotropin-releasing factor (CRF) on behavior in the elevated plus-maze. *Psychoneuroendocrinology*, v. 31, p. 1046-1056, 2006a.

GLICK, S.; GREENSTEIN, S. Possible modulating influence of frontal cortex on nigro-striatal function. *Br J Pharmacol*, v. 49, p. 316-321, 1973.

GLICK, S.; SHAPIRO, R. Functional and neurochemical mechanisms of cerebral lateralization in rats. In: GLICK, S. (Ed.). *Cerebral lateralization in nonhuman species*: New York: Academic Press; 1985. p.157-183.

GONZALEZ, D. et al. Unilateral ibotenic acid lesions of the prefrontal cortex reduce rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Acta Med Okayama*, v. 60, p. 319-324, 2006.

GONZALEZ-BURGOS I, EJANDRE-GOMEZ M, OLVERA-CORTES ME, PEREZ-VEGA MI, EVANS S, FERIA-VELASCO A. Prenatal-through-postnatal exposure to moderate levels of ethanol leads to damage on the hippocampal CA1 field of juvenile rats: a stereology and Golgi study. *Neurosci.Res.* 56: 400-408, 2006.

GOODLET, C.; WEST, J. *Maternal Substance Abuse and the Developing Nervous System*. Academic Press, p. 45-75, 1992.

GOODLETT CR, HORN KH, ZHOU FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 230: 394-406, 2005.

- GOTO Y, GRACE AA. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int.Rev.Neurobiol.* 78: 41-68, 2007.
- GREEN, K.; BRAND, M.; MURPHY, M. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, v. 53, p. 110-118, 2004.
- GRESSENS P, MESPLES B, SAHIR N, MARRET S, SOLA A. Environmental factors and disturbances of brain development. *Semin.Neonatol.* 6: 185-194, 2001.
- GUERRI C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 22: 304-312, 1998.
- GURDEN H, TAKITA M, JAY TM. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *J.Neurosci.* 20: RC106-15-11-2000.
- GURDEN H, TASSIN JP, JAY TM. Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal-prefrontal cortex long-term potentiation. *Neuroscience* 94: 1019-1027, 1999
- HANNIGAN JH, ARMANT DR. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Semin.Neonatol.* 5: 243-254, 2000.
- HANNIGAN JH, O'LEARY-MOORE SK, BERMAN RF. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 31: 202-211, 2007.
- HANNIGAN JH. Effects of prenatal exposure to alcohol plus caffeine in rats: pregnancy outcome and early offspring development. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 19: 238-246, 1995.
- HANNIGAN JH. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 55: 489-499, 1996.
- HANNIGAN, J.; BLANCHARD, B.; RILEY, E. Altered grooming responses to stress in rats exposed prenatally to ethanol. *Behav Neural Biol*, v. 47, p. 173-185, 1987.
- HARRIS RA, TRUDELL JR, MIHIC SJ. Ethanol's molecular targets. *Sci.Signal.* 1: re7-2008.
- HARRIS SR, MACKAY LL, OSBORN JA. Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 19: 660-665, 1995.
- HEATON, M. et al. Effects of ethanol on neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, endogenous antioxidants, and reactive oxygen species in neonatal striatum: relationship to periods of vulnerability. *Dev Brain Res* v. 140, p. 237-252, 2003.
- HEATON, M. et al. Ethanol effects on neonatal rat cortex: comparative analyses of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and oxidative processes during vulnerable and resistant periods. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 145, p. 249-262, 2003.

HELLEMANS KG, SLIWOWSKA JH, VERMA P, WEINBERG J. Prenatal alcohol exposure: fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 34: 791-807, 2010.

HENDERSON GI, SCHENKER S. Effects of ethanol and/or caffeine on fetal development and placental amino acid uptake in rats. *Dev.Pharmacol.Ther.* 7: 177-187, 1984.

HERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, R.; RENDÓN-RAMÍREZ, A. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. *Oxid Med Cell Longev*, p. 1-15, 2016.

HIRATA H, MACHADO LS, OKUNO CS, BRASOLIN A, LOPES GS, SMAILI SS. Apoptotic effect of ethanol is potentiated by caffeine-induced calcium release in rat astrocytes. *Neurosci.Lett.* 393: 136-140, 30-1-2006.

IERACI, A.; HERRERA, D. Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis. *Neurobiol.Dis.*, v. 26, p. 597-605, 2007.

IKONOMIDOU C, BITTIGAU P, ISHIMARU MJ, WOZNIAK DF, KOCH C, GENZ K, PRICE MT, STEFOVSKA V, HORSTER F, TENKOVA T, DIKRANIAN K, OLNEY JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287: 1056-1060, 11-2-2000.

IKONOMIDOU C. Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain Dev.* 31: 488-492, 2009.

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

IKONOMIDOU, C.; KAINDL, A. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox signal*, v. 14 p. 1535-1550, 2011.

IZQUIERDO LA, BARROS DM, VIANNA MR, COITINHO A, DEDAVID E SILVA, CHOI H, MOLETTA B, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol.Neurobiol.* 22: 269-287, 2002.

IZQUIERDO, I. *Memória*. 2. Artmed Editora S A: 2011.

JACOBSON, S. et al. Heavy Prenatal Alcohol Exposure is Related to Smaller Corpus Callosum in Newborn MRI Scans. *Alcohol Clin Exp Res.*, v. 41, p. 965-975, 2017.

JANERO, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.*, v. 9, p. 515-540, 1990.

JONASSON, Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological. *Neurosci Biobehav Rev* v. 28, p. 811-825, 2005.

JÚNIOR, A. G.; MORATO, S. Influência do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Interação em Psicologia*, v. 6, p. 141-148, 2002.

KANEKO, W.; RILEY, E.; EHLERS, C. Effects of artificial rearing on electrophysiology and behavior in adult rats. *Depress Anxiety*, v. 4, p. 279-288, 1996.

KANG SH, LEE YA, WON SJ, RHEE KH, GWAG BJ. Caffeine-induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *Neuroreport* 13: 1945-1950, 28-10-2002.

KAPLAN, G. et al. Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptorbinding and locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 248, p. 1078-1083, 1989.

KASTER, M.; MACHADO, N.; SILVA, H. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. *Proc Natl Acad Sci* v. 112, p. 7833–7838, 2015.

KELLY SJ, PIERCE DR, WEST JR. Microencephaly and hyperactivity in adult rats can be induced by neonatal exposure to high blood alcohol concentrations. *Exp.Neurol*. 96: 580-593, 1987.

KLOET, E. D.; MOLENDIJK, M. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plast.*, v. 2016:6503162, 2016.

KOGO, M.; FUNK, G.; CHANDLER, S. Rhythmical oral-motor activity recorded in an in vitro brainstem preparation. *Somatosens Mot Res*, v. 13, p. 39-48, 1996.

KOLB B, WHISHAW IQ. Plasticity in the neocortex: mechanisms underlying recovery from early brain damage. *Prog.Neurobiol*. 32: 235-276, 1989.

KRAHE TE, EL-DANAF RN, DILGER EK, HENDERSON SC, GUIDO W. Morphologically distinct classes of relay cells exhibit regional preferences in the dorsal lateral geniculate nucleus of the mouse. *J.Neurosci*. 31: 17437-17448, 30-11-2011.

KRAHE TE, GUIDO W. Homeostatic plasticity in the visual thalamus by monocular deprivation. *J.Neurosci*. 31: 6842-6849, 4-5-2011.

KRAHE, T. et al. Contralateral rotatory bias in the free-swimming test after unilateral hemispherectomy in adult Swiss mice. *Int J Neurosci*, v. 108, p. 21-30, 2001.

KUMRAL, A. et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Dev Brain Res*, v. 160, p. 146-156, 2005.

LALONDE R, STRAZIELLE C. The relation between open-field and emergence tests in a hyperactive mouse model. *Neuropharmacology* 57: 722-724, 2009.

LEDOUX, J. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, v. 23, p. 155-184, 2000.

LELO, A. et al. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol*, v. 22, n. 177-182, 1986.

- LENT, R.; SCHMIDT, S. The ontogenesis of the forebrain commissures and the determination of brain asymmetries. *Prog Neurobiol*, v. 40, p. 149-176, 1993.
- LILJELUND, P. et al. Long-term effects of diazepam treatment of epileptic GABAA receptor beta3 subunit knockout mouse in early life. *Epilepsy Res.*, v. 66, p. 99-115, 2005.
- LINNET, K. et al. Coffee consumption during pregnancy and the risk of hyperkinetic disorder and ADHD: a prospective cohort study. *Acta Paediatr*, v. 98, n. 173-179, 2009.
- LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 92, p. 180-185, 1987.
- LIVY, D. et al. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. *Neurotoxicol.Teratol.*, v. 25, p. 447-458, 2003.
- LOOMANS, E. et al. Caffeine intake during pregnancy and risk of problem behavior in 5- to 6-year-old children. *Pediatrics*, v. 130, p. 305-313, 2012.
- LUDWIG, I. et al. C.Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. *Food Research International* v. 48, p. 57-64, 2012.
- LY, H. V.; LONGO, M. L. The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers. *Biophys J*, v. 87, n. 2, p. 1013-33, 2004.
- MAIER SE, WEST JR. Regional differences in cell loss associatedwith binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol* v. 23, p. 49-57, 2001b.
- MAIER, S. et al. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 23, p. 726-734, 1999.
- MAIER, S.; WEST, J. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. *Alcohol Res Health*, v. 25, p. 168-174, 2001a.
- MANHÃES, A. et al. Neonatal transection of the corpus callosum affects rotational side preference in adult Swiss mice. *Neurosci Lett*, v. 415, p. 159-163, 2007.
- MAY PA, BLANKENSHIP J, MARAIS AS, GOSSAGE JP, KALBERG WO, JOUBERT B, CLOETE M, BARNARD R, DE VM, HASKEN J, ROBINSON LK, ADNAMS CM, BUCKLEY D, MANNING M, PARRY CD, HOYME HE, TABACHNICK B, SEEDAT S. Maternal alcohol consumption producing fetal alcohol spectrum disorders (FASD): quantity, frequency, and timing of drinking. *Drug Alcohol Depend.* 133: 502-512, 1-12-2013.
- MAY PA, FIORENTINO D, CORIALE G, KALBERG WO, HOYME HE, ARAGON AS, BUCKLEY D, STELLAVATO C, GOSSAGE JP, ROBINSON LK, JONES KL, MANNING M, CECCANTI M. Prevalence of children with severe fetal alcohol spectrum disorders in communities near rome, Italy: new estimated rates are higher than previous estimates. *Int.J.Environ.Res.Public Health* 8: 2331-2351, 2011.

MAY PA, GOSSAGE JP, KALBERG WO, ROBINSON LK, BUCKLEY D, MANNING M, HOYME HE. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. *Dev.Disabil.Res.Rev* 15: 176-192, 2009.

MAY PA, GOSSAGE JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res.Health* 25: 159-167, 2001.

MCKLVEEN, J. et al. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biol Psychiatry.*, v. 74, p. 672-679, 2013.

MEDINA AE, KRAHE TE, COPPOLA DM, RAMOA AS. Neonatal alcohol exposure induces long-lasting impairment of visual cortical plasticity in ferrets. *J Neurosci.* 23: 10002-10012, 5-11-2003.

MEDINA AE, KRAHE TE, RAMOA AS. Restoration of neuronal plasticity by a phosphodiesterase type 1 inhibitor in a model of fetal alcohol exposure. *J.Neurosci.* 26: 1057-1060, 18-1-2006.

MEDINA AE. Fetal Alcohol Spectrum Disorders and Abnormal Neuronal Plasticity. *Neuroscientist.* 17: 274-287, 7-3-2011.

MEDINA, A.; KRAHE, T. Neocortical plasticity deficits in fetal alcohol spectrum disorders: lessons from barrel and visual cortex. *J Neurosci Res.*, v. 86, p. 256-263, 2008.

MELCER T, GONZALEZ D, BARRON S, RILEY EP. Hyperactivity in preweanling rats following postnatal alcohol exposure. *Alcohol* 11: 41-45, 1994.

MELCHIOR M, CHOLLET A, GLANGEAUD-FREUDENTHAL N, SAUREL-CUBIZOLLES MJ, DUFOURG MN, VAN DER WAERDEN J, SUTTER-DALLAY AL. Tobacco and alcohol use in pregnancy in France: The role of migrant status: The nationally representative ELFE study. *Addict.Behav.* 51: 65-71, 26-7-2015.

MENDONCA, A. D.; RIBEIRO, J. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.*, v. 60, p. 245-251, 1997.

MIDDAUGH LD, BOGGAN WO. Postnatal growth deficits in prenatal ethanol-exposed mice: characteristics and critical periods. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 15: 919-926, 1991.

MILLER, D.; BUETTNER, G.; AUST, S. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, v. 8 p. 95-108, 1990.

MIRANDA RC. Micro RNAs and Fetal Brain Development: Implications for Ethanol Teratology during the Second Trimester Period of Neurogenesis. *Front Genet.* 3: 77-2012.

MLP, B.; LMG, A. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição*, v. 12, p. 123-130, 1999.

MOHR, C. et al. Human side preferences in three different whole-body movement tasks. *Behav Brain Res*, v. 151, p. 321-326, 2004.

MONTEIRO, M.; TRUGO, L. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim Nova*, v. 28, p. 637-641, 2005.

MONTUSCHI, P. et al. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients *Am J Respir Crit Care Med*, v. 160, p. 216-220, 1999.

MORELAND, N.; GRANGE, L. L.; MONTOYA, R. Impact of in utero exposure to EtOH on corpus callosum development and paw preference in rats: protective effects of silymarin. *Complement Altern Med.*, v. 2, p. 100, 2002.

MUKHERJEE RA, Hollins S, Turk J. Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. *J R.Soc.Med.* 99: 298-302, 2006.

MYERS, B.; MCKLVEEN, J.; HERMAN, J. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: implications for the energetics of stress. *Front Neuroendocrinol.* , v. 35, p. 180-196, 2014.

MYERS, C.; GLUCK, M. Context, conditioning, and hippocampal rerepresentation in animal learning. *Behav Neurosci*, v. 108, p. 835-847, 1994.

NEHLIG A, DEBRY G. Potential teratogenic and neurodevelopmental consequences of coffee and caffeine exposure: a review on human and animal data. *Neurotoxicol.Teratol.* 16: 531-543, 1994.

NICCOLS, A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain Cogn*, v. 65, p. 135-142, 2007.

NIELSEN, D. et al. Paw preference, rotation, and dopamine function in Collins HI and LO mouse strains. *Physiol Behav*, v. 61, p. 525-535, 1997.

NUNES F, FERREIRA-ROSA K, PEREIRA MD, KUBRUSLY RC, MANHÃES AC, ABREU-VILLAÇA Y, FILGUEIRAS CC. Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend.* 119: 81-87, 18-6-2011.

NUNEZ, J.; MCCARTHY, M. Cell death in the rat hippocampus in a model of prenatal brain injury: time course and expression of death-related proteins. *Neuroscience*, v. 129, p. 393-402, 2004.

OJEDA, L. et al. The role of folic acid and selenium against oxidative damage from ethanol in early life programming: a review. *Biochem Cell Biol.*, v. 96, p. 178-188, 2018.

OLNEY JW, FARBER NB, WOZNIAK DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou C. Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ.Health Perspect.* 108 Suppl 3: 383-388, 2000.

OLNEY JW. Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addict.Biol.* 9: 137-149, 2004.

- O'MALLEY, K.; NANSON, J. Clinical implications of a link between fetal alcohol spectrum disorder and attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry*, v. 47, p. 349-354, 2002.
- OSBORN, J. et al. Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 22, p. 685-696, 1998.
- PAOLOZZA, A. et al. Altered accuracy of saccadic eye movements in children with fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 37, p. 1491-1498, 2013.
- PELLOW, S. et al. Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, p. 149-167, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 24, p. 525-529, 1986.
- PEREIRA, O C F. *Rumex induratus: Caracterização Química e Potencial Antioxidante*. 128 (Master). Universidade do Porto, 2009.
- PHILLIPS, R.; LEDOUX, J. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, v. 106, p. 274-285, 1992.
- PINSKY, I.; BESSA, M. A. *Adolescência e Drogas 3*. São Paulo 2004.
- PROBYN, M. et al. A rodent model of low- to moderate-dose ethanol consumption during pregnancy: patterns of ethanol consumption and effects on fetal and offspring growth. *Reprod Fertil Dev*, v. 24, p. 859-870, 2012.
- PRUT, L. et al. A reduction in hippocampal GABAA receptor alpha5 subunits disrupts the memory for location of objects in mice. *Genes Brain Behav*, v. 9, p. 478-488, 2010.
- RASMUSSEN C. Executive functioning and working memory in fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin.Exp.Res*. 29: 1359-1367, 2005.
- RIDDERINKHOF, K. et al. The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science*, v. 306, p. 443-447, 2004.
- RIIKONEN, R. et al. Brain perfusion SPECT and MRI in fetal alcohol syndrome. *Dev Med Child Neurol*, v. 41, p. 652-659, 1999.
- RILEY EP, BARRON S, MELCER T, GONZALEZ D. Alterations in activity following alcohol administration during the third trimester equivalent in P and NP rats. *Alcohol Clin.Exp.Res*. 17: 1240-1246, 1993.
- RILEY EP, INFANTE MA, WARREN KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol.Rev*. 21: 73-80, 2011.
- RILEY, E.; LOCHRY, E.; SHAPIRO, N. Lack of response inhibition in rats prenatally exposed to alcohol. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 62, p. 47-52, 1979.

RILEY, E.; MCGEE, C.; SOWELL, E. Teratogenic Effects of alcohol: a decade of brain imaging. *Am J Med Genet Part C (Semin Med Genet)*, v. 127, p. 35-41, 2004.

RODGERS, R.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 21, p. 801-810, 1997.

ROSEN, G.; SHERMAN, G.; GALABURDA, A. Interhemispheric connections differ between symmetrical and asymmetrical brain regions. *Neuroscience* v. 33, p. 525-522, 1989.

ROSKAM, S.; KOCH, M. Effects of neonatal and peripubertal ethanol treatment on various aspects of adult rat behavior and brain anatomy. *Int J Dev Neurosci* v. 27, p. 249-156, 2009.

ROSS CP, PERSAUD TV. Early embryonic development in the rat following in utero exposure to alcohol and caffeine. *Histol.Histopathol.* 1: 13-17, 1986.

ROSS CP, PERSAUD TV. Neural tube defects in early rat embryos following maternal treatment with ethanol and caffeine. *Anat.Anz.* 169: 247-252, 1989.

SADRIAN B, LOPEZ-GUZMAN M, WILSON DA, SAITO M. Distinct neurobehavioral dysfunction based on the timing of developmental binge-like alcohol exposure. *Neuroscience* 280: 204-219, 7-11-2014.

SAGVOLDEN T, RUSSELL VA, AASE H, JOHANSEN EB, FARSHBAF M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol.Psychiatry* 57: 1239-1247, 2005.

SALLABERRY, C. et al. Sex differences in the effects of pre- and postnatal caffeine exposure on behavior and synaptic proteins in pubescent rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 81, p. 416-425, 2018.

SAVAGE, D. et al. Effects of a novel cognition-enhancing agent on fetal ethanol-induced learning deficits. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 34, p. 1793-1802, 2010.

SCHMIDT, S.; FILGUEIRAS, C.; KRAHE, T. Effects of sex and laterality on the rotatory swimming behavior of normal mice. *Physiol Behav*, v. 65, p. 607-616, 1999.

SCHNEIDER, C.; OLIVEIRA, A. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME*, v. 10, p. 308-313, 2004.

SCHWARTING, R.; HUSTON, J. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol*, v. 49, p. 215-266, 1996.

SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A.; OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia. 2.* São Paulo: Atheneu, 2003.

SENECKY Y, WEISS N, SHALEV SA, PELEG D, INBAR D, CHODICK G, NACHUM Z, BAR-HAMBURGER R, SHUPER A. Alcohol consumption during pregnancy among women in Israel. *J.Popul.Ther.Clin.Pharmacol.* 18: e261-e272, 2011.

SHEN, H. et al. A critical role for alpha4betadelta GABAA receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science*, v. 327, p. 1515-1518, 2010.

- SHI, D.; PADGETT, W.; DALY, J. Caffeine analogs: effects on ryanodine-sensitive calcium-release channels and GABAA receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 23, p. 331–347, 2003.
- SILVERMAN JL, YANG M, LORD C, CRAWLEY JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat.Rev.Neurosci.* 11: 490-502, 2010.
- SINNER, B. et al. The toxic effects of s(+)-ketamine on differentiating neurons in vitro as a consequence of suppressed neuronal Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Anesth.Analg.*, v. 113, p. 1161-1169, 2011.
- SLAWECKI CJ, THOMAS JD, RILEY EP, EHLERS CL. Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat. *Alcohol* 34: 187-196, 2004.
- SLIWOWSKA, J. et al. Stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in adult male rats is altered by prenatal ethanol exposure. *Stress*, v. 13, p. 301-313, 2012.
- SOWELL, E. et al. Abnormal cortical thickness and brain-behavior correlation patterns in individuals with heavy prenatal alcohol exposure. *Cere Cortex*, v. 18, p. 136-144, 2008.
- SPOHR HL, WILLMS J, STEINHAUSEN HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr.* 150: 175-9, 179, 2007.
- STAPLES, M. et al. Impact of combined prenatal ethanol and prenatal stress exposure on anxiety and hippocampal-sensitive learning in adult offspring. *Alcohol Clin Exp Res*, v. 37, p. 2039-2047, 2013.
- STEVENS SA, NASH K, KOREN G, ROVET J. Autism characteristics in children with fetal alcohol spectrum disorders. *Child Neuropsychol.* 19: 579-587, 2013.
- STREISSGUTH AP, BARR HM, MARTIN DC, HERMAN CS. Effects of maternal alcohol, nicotine, and caffeine use during pregnancy on infant mental and motor development at eight months. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 4: 152-164, 1980.
- SULIK KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 230: 366-375, 2005.
- TANDA G, GOLDBERG SR. Alteration of the behavioral effects of nicotine by chronic caffeine exposure. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 66: 47-64, 2000.
- THE WORLD HEALTH REPORT. Global Status Report on Alcohol 2014. 1-86, 2014.
- THOMAS JD, FLEMING AND SL, RILEY EP. MK-801 can exacerbate or attenuate behavioral alterations associated with neonatal alcohol exposure in the rat, depending on the timing of administration. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 25: 764-773, 2001.
- TURMANJR, J.; AJDARI, J.; CHANDLER, S. NMDA receptor NR1 and NR2A/B subunit expression in trigeminal neurons during early postnatal development. *J Comp Neurol.*, v. 1999, p. 237-249, 1999.

TYE, K. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, v. 493, p. 537-541, 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAURIO, L.; RILEY, E.; MATTSON, S. Differences in executive functioning in children with heavy prenatal alcohol exposure or attention deficit/ hyperactivity disorder. *J Int Neuropsychol Soc*, v. 14, p. 119-129, 2008.

VIRGOLINI, M. et al. Interactions of chronic lead exposure and intermittent stress: consequences for brain catecholamine systems and associated behaviors and HPA axis function. *Toxicol Sci*, v. 87, p. 469-482, 2005.

VIRGOLINI, M. et al. Permanent alterations in stress responsivity in female offspring subjected to combined maternal lead exposure and/or stress. *Neurotoxicology*, v. 27, p. 11-21, 2006.

WAINWRIGHT, P.; GAGNON, M. Moderate prenatal ethanol exposure interacts with strain in affecting brain development in BALB/c and C57BL/6 mice. *Exp Neurol*, v. 88, p. 84-94, 1985.

WANG, M. et al. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, v. 5, p. 705-710, 1996.

WARREN, S.; JURASKA, J. Spatial and non spatial learning across the rat Estrous cycle. *Behavioral Neurosciences* v. 111, p. 259-166, 1997.

WEICHELDT, U. et al. Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine. *Eur Respir J*, v. 41, p. 966–973, 2013.

WELCH, K. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med*, v. 32, p. 577-583, 2002.

WELCH-CARRE E. The neurodevelopmental consequences of prenatal alcohol exposure. *Adv. Neonatal Care* 5: 217-229, 2005.

WELLS, J.; KRAMER, G. Phosphodiesterase inhibitors as tools in cyclic nucleotide research: a precautionary comment. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 23, p. 1-9, 1981.

WELLS, P. et al. Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine. *Birth Defects Res C Embryo Today.*, v. 108, p. 108-130, 2016.

WHITE, L. et al. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v. 225, p. 1-27, 2007.

WILCOXON, J. et al. Behavioral deficits associated with fetal alcohol exposure are reversed by prenatal thyroid hormone treatment: a role for maternal thyroid hormone deficiency in FAE. *Mol Psychiatry*, v. 10, p. 961-971, 2005.

WILENSKY, A. et al. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci*, v. 26, p. 12387-12396, 2006.

WOOD, L. et al. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids*, v. 35, p. 967-974, 2000.

ZELNER I, Koren G. Alcohol consumption among women. *J.Popul.Ther.Clin.Pharmacol.* 20: e201-e206, 2013.

ZHANG, Y. et al. A review of interventions against fetal alcohol spectrum disorder targeting oxidative stress. *Int J Dev Neurosci.*, v. 71, p. 140-145, 2018.

ZHOU, R.; WANG, S.; ZHU, X. Prenatal ethanol exposure attenuates GABAergic inhibition in basolateral amygdala leading to neuronal hyperexcitability and anxiety-like behavior of adult rat offspring. *Neuroscience*, v. 170, p. 749-757, 2010.

ZIMMERBERG, B.; REUTER, J. Sexually dimorphic behavioral and brain asymmetries in neonatal rats: effects of prenatal alcohol exposure. *Dev Brain Res*, v. 46, p. 281-290, 1989.

ZIMMERBERG, B.; RILEY, E. Side preference behavior in rats exposed to alcohol prenatally. *Neurobehav Toxicol Teratol*, v. 8, p. 631-635, 1986.