



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes

Fernanda Barbosa Nunes Coelho

Efeitos da administração de inibidores de fosfodiesterases na reversão da hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos

Rio de Janeiro

2010

Fernanda Barbosa Nunes Coelho

Efeitos da administração de inibidores de fosfodiesterases na reversão da hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Yael de Abreu Villaça
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA

C672 Coelho, Fernanda Barbosa Nunes.

Efeitos da administração de inibidores de fosfodiesterases na reversão da hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos / Fernanda Barbosa Nunes Coelho. – 2010.

103 f. : il.

Orientadora: Yael de Abreu Villaça.

Coorientador: Cláudio Carneiro Filgueiras.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Centro Biomédico.

1. Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade – Teses. . 2. Sistema nervoso – Fisiologia – Teses. 3. Etanol - Teses. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Filgueiras, Cláudio Carneiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia. Centro Biomédico. IV. Título.

CDU 616.89-008.47

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

Assinatura

Data

Fernanda Barbosa Nunes Coelho

Efeitos da administração de inibidores de fosfodiesterases na reversão da hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em 21 de outubro de 2010.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientadora)
Universidade do estado do Rio de Janeiro - UERJ

Profa. Dra. Karen de Jesus Oliveira
Universidade Federal Fluminense - UFF

Profa. Dra. Penha Cristina Barradas
Universidade do estado do Rio de Janeiro - UERJ

Profa. Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva
Universidade do estado do Rio de Janeiro - UERJ

Profa. Dra. Tania Marcourakis
Universidade de São Paulo - USP

Rio de Janeiro

2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo carinho e apoio incondicionais na caminhada até aqui. À Denny e ao Otto por simplesmente fazerem parte da minha vida.

À minha orientadora Yael por todo apoio durante a realização deste e outros trabalhos, por todas as orientações e por seguir comigo até aqui. Ao Cláudio por ter aceito me orientar na iniciação científica e por ter me apoiado desde então, durante todos esses anos, me ajudando a trilhar os melhores caminhos até aqui. Ao Alex por todo apoio e incentivo, sempre, nos mais diversos setores. Aos três por tudo, por estarem sempre presentes, me auxiliando nesta caminhada. À professora Regina Kubruly e ao aluno Maurício pelo suporte técnico.

Aos meus companheiros de laboratório: Monique, Chris, Sylvão, Mabel, Ulisses, Carlitcha, Aninha, Kélvia, Fabi, Jú e Jú, Ana do Flúor, Dani, André, Anderson, Ana Heloísa, Nathalie, Bruno, Victor, enfim, a todos os membros do laboratório de Neurofisiologia.

Às minhas amigas Fabiôla, Gisa e Li por seguirem comigo durante longos anos, vibrando a cada conquista, por estarem presentes nos momentos difíceis e nos mais felizes, pela amizade incondicional. A Gabizita, Cris, Andreia, Ivanzito e Marquito, por conseguirem me fazer rir mesmo nos momentos mais difíceis. As minhas amigas Flávia e Dedê pelo carinho de sempre.

Aos meus queridos amigos da UNI-RIO, por 10 anos de alegria e amizade. Cada encontro de turma só reforça esse laço de amizade e me faz ter certeza da feliz escolha de ser bióloga. Sou privilegiada de ter convivido e ainda conviver com pessoas como vocês. Pri, Carine, Xande, Cris, Iuri, Paulinha, Dread, Dudu, Maíra, Monique e todos os demais “biologistas”, é muita gente, por isso, sintam-se todos citados.

Cada minuto que passa pode ser tudo o que me resta para viver, mas eu desperdiço o tempo como se ele fosse infinito. Penso, logo sei que existir é uma circunstância.

Pedro Cassiano Aguilar

RESUMO

COELHO, Fernanda Barabosa Nunes. *Efeitos da administração de inibidores de fosfodiesterases na reversão da hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos*. 2010, 103 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O consumo de etanol durante a gestação é um grave problema de saúde pública. Durante o desenvolvimento, o sistema nervoso é especialmente susceptível aos efeitos tóxicos do etanol e a exposição ao etanol durante este período pode gerar um amplo espectro de distúrbios neurocomportamentais, sendo o mais frequente, a hiperatividade. Recentemente, estudos têm sugerido que distúrbios na plasticidade neuronal podem estar relacionados com a hiperatividade. Os inibidores de PDE são drogas que agem impedindo a degradação de segundos mensageiros celulares como AMPc e GMPc, mantendo a ativação de proteínas quinases e de fatores de transcrição como o CREB, levando a expressão de genes relacionados à plasticidade. Neste trabalho, avaliamos através do teste de campo aberto se a administração de Vinpocetina ou Rolipram (inibidores de PDE) seria capaz de amenizar ou reverter a hiperatividade de camundongos Suíços expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação humana. Para tanto, foram realizadas duas etapas: na primeira etapa, durante o período neonatal, os animais receberam injeções intraperitoneais de etanol (5g/Kg em solução salina a 25%, no 2º, 4º, 6º e 8º dias de vida pós-natal - PN2 a PN8) ou de salina, e 4 horas antes do teste comportamental no campo aberto (10 min), em PN30, receberam Vinpocetina (10mg/Kg ou 20mg/Kg diluídas em DMSO ip) ou somente DMSO ip. Na segunda etapa, os animais foram expostos ao etanol ou à salina no período neonatal nas mesmas condições da primeira etapa e no dia do teste comportamental receberam Rolipram (0,5mg/Kg diluídas em DMSO ip ou somente DMSO ip). Posteriormente aos testes, foram coletados o córtex cerebral frontal e o hipocampo dos animais para avaliação dos níveis de AMPc. Os resultados comportamentais indicam que somente o tratamento com Vinpocetina (20mg/Kg) reverteu a hiperatividade de camundongos expostos ao etanol, resultado que não foi observado com o tratamento com Rolipram. Desta forma, a dosagem dos níveis de AMPc foi realizada apenas nos animais que receberam injeção de Vinpocetina (20mg/Kg). A exposição neonatal ao etanol reduziu significativamente os níveis de AMPc no córtex e no hipocampo. O tratamento com Vinpocetina gerou um aumento nos níveis de AMPc no córtex e restaurou estes níveis no hipocampo. Nossos resultados sugerem que a reversão da hiperatividade pelo tratamento com Vinpocetina pode estar associada ao aumento da plasticidade neural induzida por esta droga.

Palavras-chave: Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade. Sistema nervoso. Etanol.

ABSTRACT

Ethanol consumption during gestation is a serious public health problem. During development, the nervous system is particularly susceptible to the toxic effects of ethanol and, in fact, ethanol exposure during perinatal development produces a range of neurobehavioral deficits, among which hyperactivity is one of the most frequently observed. There is evidence that reduced neuronal plasticity could be associated with hyperactivity. PDE inhibitors are drugs that prevent the breakdown of intracellular second-messengers such as cAMP and cGMP, maintaining the activation of protein kinases and of the CREB transcription factor, leading to the expression of plasticity-related genes. In this study we test whether Vinpocetine or Rolipram (PDE inhibitors) treatment can improve or revert hyperactivity in Swiss exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. To that end, two experiments were carried out: In the first one, from postnatal day (PN) 2 to PN8, litters either received ethanol (5g/Kg i.p., 25% in saline solution) or an equivalent volume of saline solution every other day. On PN30, 4 h before the open field test (which lasted for 10 min) animals received Vinpocetine (10mg/Kg or 20mg/Kg diluted in DMSO i.p.) or dimethylsulfoxide (DMSO i.p.). In the second experiment animals were treated almost as before receiving Rolipram (0.5mg/Kg diluted in DMSO i.p.), instead of Vinpocetine, or DMSO i.p. After the tests, animals were sacrificed and frontal cerebral cortices and hippocampuses were dissected and collected for the analysis of cAMP levels. Behavioral results showed that only the Vinpocetine treatment (20mg/Kg) reversed the ethanol-elicited hyperactivity, a result that was not observed for the Rolipram treatment. In this way, the dosage of cAMP levels was done only for the animals that received received Vinpocetine (20mg/Kg). Ethanol neonatal exposure significantly reduced cAMP levels both in the cortex and in the hippocampus. Vinpocetine treatment increased cAMP levels in the cortex and restored it in the hippocampus. Our results suggest that the amelioration of the ethanol-induced hyperactivity by Vinpocetine is linked to an increased neuronal plasticity induced by this drug.

Key-words: Attention deficit hyperactivity disorder. Nervous system. Ethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da cascata de ativação do CREB	23
Figura 2	Foto em vista superior da arena do campo aberto	34
Figura 3	Médias (+EPM) da ambulação na periferia – Estudo 1	43
Figura 4	Médias (+EPM) da ambulação total – Estudo 1	43
Figura 5	Médias (+EPM) da ambulação no centro – Estudo 1	44
Figura 6	Médias (+EPM) dos níveis de AMPc no hipocampo – Estudo 1	45
Figura 7	Médias (+EPM) dos níveis de AMPc no córtex – Estudo 1	46
Figura 8	Médias (+EPM) da ambulação na periferia – Estudo 2	48
Figura 9	Médias (+EPM) da ambulação total – Estudo 2	49
Figura 10	Médias (+EPM) da ambulação no centro – Estudo 2	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características da FASD relacionadas à idade	20
Tabela 2	Tipos de fosfodiesterases e sua distribuição no sistema nervoso	24
Tabela 3	Peso médio das ninhadas no Estudo 1	41
Tabela 4	Peso médio das ninhadas no Estudo 2	46

LISTA DE ABREVIACOES

AMP	adenosina monofosfato
ANOVA	análise de variância
ANOVA _r	análise de repetição
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca ⁺⁺
DMSO	dimetilsulfóxido
FASD	Fetal Alcohol Spectrum Disorder
GABA	cido gama aminobutirico
GMP	guanosina monofosfato
LTP	long term potentiation- potencial de longa duração
nAChRs	receptores nicotínicos acetilcolnicos
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDE	fosfodiesterases
PN	da de vida pós-natal
ROL	Rolipram ®
VP	Vinpocetina ®

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 Metabolismo do etanol	13
1.1 Mecanismo de ação e Neurotoxicidade do etanol	14
1.2 Neurotoxicidade do etanol durante o desenvolvimento	15
1.3 Neuroplasticidade	20
1.3.1 <u>Fosfodiesterases</u>	23
1.3.2 <u>O etanol afeta a neuroplasticidade</u>	25
1.3.3 <u>Etanol, neuroplasticidade e hiperatividade</u>	27
2 OBJETIVOS	30
3 METODOLOGIA	31
3.1 Animais	31
3.2 Estudo 1	31
3.2.1 <u>Formação dos grupos experimentais</u>	31
3.2.2 <u>Taxa de sobrevivência</u>	33
3.2.3 <u>Peso corporal</u>	33
3.2.4 <u>Teste comportamental</u>	33
3.2.5 <u>Quantificação de etanol no soro dos animais</u>	35
3.2.6 <u>Dosagem de AMPc</u>	35
3.2.7 <u>Análise estatística</u>	37
3.3 Estudo 2	38
3.3.1 <u>Formação dos grupos experimentais</u>	38
3.3.2. <u>Peso corporal</u>	39
3.3.3. <u>Teste comportamental</u>	39
3.3.4. <u>Análise estatística</u>	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Estudo 1	41
4.1.1 <u>Peso corporal no período neonatal e no dia do teste</u>	41
4.1.2 <u>Taxa de sobrevivência</u>	41
4.1.3 <u>Quantificação de etanol no soro</u>	41
4.1.4. <u>Medidas de ambulação</u>	42
4.1.5. <u>Níveis de AMPc</u>	44

4.2 Estudo 2	46
4.2.1. <u>Peso corporal no período neonatal e no dia do teste</u>	46
4.2.2. <u>Medidas de ambulação</u>	47
5 DISCUSSÃO	51
5.1 Resumo dos resultados	51
5.2 Injeção intraperitoneal, ganho de peso e mortalidade	51
5.3 Ambulação no centro e na periferia do campo aberto	53
5.4 Neurobiologia do Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade	54
5.5 TDAH e sua e sua relação com a FASD	55
5.6 Restauração dos níveis de AMPc no hipocampo pelo tratamento com Vinpocetina	56
5.7 Inibidores da fosfodiesterase e reversão da hiperatividade	57
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Manuscrito submetido para publicação	83

INTRODUÇÃO

O etanol está entre as drogas não terapêuticas mais consumidas no mundo. Estima-se que consumo de álcool seja responsável por 2,5 milhões de mortes (3,8% do total) e 69,4 milhões (4,5% do total) de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (Disability-Adjusted Life Years- DALYs). Somente danos não intencionais são responsáveis por cerca de um terço dos 2,5 milhões de mortes, enquanto desordens neuropsiquiátricas são responsáveis por quase 40% do 69,4 milhões de DALYs (WHO, 2004).

No Brasil estima-se que 24% da população masculina entre 18-24 anos seja dependente de álcool assim como 7,5% das mulheres na mesma faixa etária (CEBRID, 2002). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, o uso e abuso de álcool é o maior fator de risco à saúde do brasileiro, sendo em média duas vezes mais potente que fatores decorrentes do tabagismo (WHO, 2002).

1 METABOLISMO DO ETANOL

No estado não alimentado o etanol é absorvido principalmente pelo duodeno e jejuno devido a sua rápida passagem pelo estômago vazio. Alimentos sólidos e soluções hipertônicas aumentam o tempo de permanência do etanol na cavidade gástrica. Quando o etanol é consumido juntamente com comida ou quando o estômago está cheio, quantidades substanciais são absorvidas pelo estômago; quase 70% do etanol ingerido pode ser absorvido pelo estômago nessas condições (Cortot *et al.*, 1986). A quantidade de etanol absorvida pelo estômago ou pelo intestino delgado contribui para determinar a concentração de etanol na circulação sistêmica e sistema nervoso central. O etanol é ingerido, absorvido e passa via circulação portal através do fígado para circulação sistêmica (Eckardt *et al.*, 1998).

O etanol se distribui nos líquidos corporais e, num estado de equilíbrio, as concentrações intra e extracelulares são aproximadamente iguais. O equilíbrio é estabelecido mais rapidamente em órgãos bem vascularizados que apresentam alto fluxo sanguíneo (ex. cérebro, fígado, pulmão, rins) do que em tecidos com menor fluxo sanguíneo (Eckardt *et al.*, 1998). O etanol é eliminado quase inteiramente pelo metabolismo oxidativo no fígado. A capacidade do cérebro de metabolizar o etanol tem sido uma questão controversa. Diversos grupos têm relatado metabolismo do etanol pelo tecido cerebral em condições específicas enquanto outros grupos não relatam tal metabolização por este tecido (Zimatkin e Deitrich,

1997). De fato, mesmo em estudos que demonstram a metabolização do etanol pelo cérebro, a taxa de metabolização quando corrigida por grama de tecido varia de 1/100 a 1/1000 em relação à taxa de metabolização do fígado (Tabakoff e von Wartburg, 1975; Veloso *et al.*, 1972).

O metabolismo do etanol em acetaldeído ocorre essencialmente no fígado através da ação de três enzimas: a álcool desidrogenase (ADH) que catalisa a oxidação a acetaldeído, o sistema microsomal hepático de oxidação do etanol (MEOS) que compreende isoformas do citocromo P-450, e a catalase. Dentre as 3 enzimas, a catalase é a que apresenta menor contribuição pois é taxa-limitada pela disponibilidade de um co-substrato, o peróxido de hidrogênio. A contribuição do MEOS torna-se significativa apenas quando a concentração de etanol no fígado torna-se elevada. Em contraste, a ADH metaboliza o etanol em diversas concentrações. Posteriormente, o etanol é oxidado de acetaldeído a acetato pela enzima acetaldeído desidrogenase (Eckardt *et al.*, 1998).

1.1 Mecanismos de ação e neurotoxicidade do etanol

Não se conhece nenhum receptor específico para o etanol. O etanol tem sua ação inicial numa variedade de alvos nas membranas celulares e sinais intracelulares de transdução, induzindo efeitos em receptores de neurotransmissores e neurohormônios e canais iônicos voltagem-dependentes e dependentes da ligação a substâncias químicas (Koob *et al.*, 1998). Desta forma, o etanol exerce seu efeito através de interações dose-dependentes com diversos sistemas neurais, incluindo: GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico e sistemas opióides (Eckardt *et al.*, 1998).

Os receptores GABAérgicos e glutamatérgicos estão entre os mais importantes alvos para os efeitos comportamentais do etanol. Entretanto, dados da literatura a respeito da modulação do etanol nestes receptores têm sido controversos (Moriguchi *et al.*, 2007). Dados na literatura sugerem que a potencialização da atividade do receptor GABA depende da combinação das subunidades dos receptores (Wafford e Whiting, 1992; Wafford *et al.*, 1990, 1991), da viabilidade celular (Aguayo *et al.*, 2002), dos tipos celulares (Mori *et al.*, 2000; Sapp e Yeh, 1998) e dos processamentos que ocorrem após a tradução, incluindo fosforilação do receptor (Harris *et al.*, 1995).

Os nAChRs (receptores nicotínicos de acetilcolina) têm sido reconhecidos como importantes sítios de ação do etanol. Os nAChRs estão localizados no corpo celular, nas regiões pré-terminais e pré-sinápticas GABAérgicas e em outros neurônios em diferentes

regiões cerebrais como o córtex e o hipocampo. A ativação destes nAChRs têm mostrado aumentar a liberação sináptica de GABA, de glutamato, e de outros neurotransmissores (Alkodon *et al.*, 1997, 1999, 2000; Colquhoun e Patrick, 1997; Genzen e McGehee, 2003, 2005; Gray *et al.*, 1996; Lindstrom, 1997; Role e Berg, 1996; Wonnacott, 1997; Yang *et al.*, 1996). Desta forma, a modulação dos nAChRs causada pelo etanol pode levar a uma cascata de eventos sinápticos envolvendo múltiplos neurotransmissores.

Nas últimas décadas tem sido demonstrada uma relação entre o sistema serotoninérgico cerebral e o consumo de etanol tanto em humanos como em modelos animais. Agentes capazes de inibir a recaptação de serotonina na fenda sináptica diminuem o consumo de etanol em roedores, galinhas, macacos e humanos (LeMarquand *et al.*, 1994a; LeMarquand *et al.*, 1994b). Adicionalmente, Murphy e colaboradores (Murphy *et al.*, 1987) demonstraram que ratos que apresentavam preferência pelo etanol tinham níveis de serotonina aproximadamente 20% menores em regiões límbicas do que ratos que não apresentavam preferência pelo etanol.

Amplas evidências indicam que o sistema mesocorticolímbico dopamérgico desempenha importante papel no sistema de reforço e recompensa do etanol em animais experimentais assim como em humanos (Engel *et al.*, 1999; Koob, 1992). Estudos demonstram que o etanol aumenta a atividade de neurônios mesolímbicos dopaminérgicos (Eckardt *et al.*, 1998) e Carboni e colaboradores demonstraram que a administração de um antagonista de serotonina atenua a estimulação da liberação de dopamina no *nucleus accumbens* de ratos induzida pela administração de etanol (Carboni *et al.*, 1989). Essa interação entre os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos desempenha importante papel no aumento de liberação da dopamina desencadeado pelo etanol em áreas como o *nucleus accumbens* e pode sugerir um mecanismo pelo qual a serotonina medeia propriedades de reforço do etanol (Eckardt *et al.*, 1998).

1.2 Neurotoxicidade do etanol durante o desenvolvimento

O etanol é um potente agente teratogênico (Hannigan e Armant, 2000). Atravessa livremente a placenta e, portanto, os níveis de álcool no sangue dos fetos são semelhantes aos das mães (Welch-Carre, 2005). A exposição ao álcool durante a gestação pode acarretar em uma série de transtornos que podem persistir por um longo período da vida do indivíduo (Hannigan e Armant, 2000; Spohr *et al.*, 2007; Welch-Carre, 2005).

Historicamente, diversos termos têm sido utilizados, sem consenso, por profissionais da área de saúde e pesquisadores para nomear estes efeitos, dentre os mais utilizados estão a Síndrome Alcoólica Fetal (FAS, *Fetal Alcohol Syndrome*), Desordem Neurocomportamental Relacionada ao Álcool (ARND, *Alcohol Related Neurobehavioral Disorder*), Defeitos de Nascimento Relacionados ao Álcool (ARBD, *Alcohol-Related Birth Defects*) e Efeitos do Álcool no Feto (FAE, *Fetal Alcohol Effects*).

Atualmente a sigla FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder*) é utilizada internacionalmente para descrever o complexo quadro clínico de manifestações diversas, decorrentes da exposição ao etanol durante o período da gravidez. Tais manifestações caracterizam-se por um grupo de sinais e sintomas relacionados ao comprometimento do sistema nervoso central e de outros órgãos (Lima, 2008). Estes sintomas podem ser físicos, mentais ou comportamentais, e podem persistir durante toda vida do indivíduo (Riley e McGee, 2005). A FASD pode incluir alterações comportamentais como a hiperatividade (Burd *et al.*, 2003), o déficit de atenção (Burden *et al.*, 2005), danos no processamento visual (Uecker e Nadel, 1996), comportamento autista (Harris *et al.*, 1995) e déficits de aprendizado e memória (Rasmussen, 2005) entre outras.

Diversos estudos têm apontado a exposição a grandes quantidades de álcool durante a gestação como a principal causa de retardo mental no mundo (Klintsova *et al.*, 2000; May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos são registrados pelo menos 40.000 casos por ano (Klug e Burd, 2003). Estima-se que a prevalência de disfunções do sistema nervoso central decorrentes da exposição ao álcool durante a gestação é de 10 casos por 1.000 nascimentos (Klintsova *et al.*, 2000; May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr *et al.*, 2007), taxa esta que é duas vezes maior que a soma da ocorrência dos dois defeitos congênitos do sistema nervoso mais comuns (síndrome de Down e espinha bífida) (Klintsova *et al.*, 2000; May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr *et al.*, 2007).

Contudo, apesar de inúmeras campanhas alertando sobre os riscos do consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação, o número de casos envolvendo indivíduos com sequelas decorrentes do consumo de álcool durante a gestação tem se mantido relativamente estável ao longo dos últimos anos (Cudd, 2005; Spohr *et al.* 2007). O consumo de grandes quantidades de álcool por gestantes - 5 doses ou mais por ocasião (CDC, 2002a, 2002b) - permanece praticamente inalterado, com taxas em torno de 2% desde 1991 (CDC, 2009) e mais de 11% das gestantes continuam a beber durante a gravidez (CDC, 2009; Stratton *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que a FASD ocorre muito menos por ignorância do que como consequência do uso compulsivo de álcool por parte das gestantes.

Estudos em modelos animais têm revelado que o etanol é capaz de afetar muitos eventos do desenvolvimento neural incluindo a proliferação celular, a adesão entre células, a morte celular programada, a migração, o crescimento axonal e a sinaptogênese (ver, por exemplo, Goodlett *et al.*, 2005). Esta gama de efeitos neurotóxicos do etanol pode se manifestar através de múltiplos mecanismos moleculares, tais como: 1) alteração na regulação da expressão gênica (redução na sinalização do ácido retinóico, expressão de gene homeobox, metilação do DNA alterada; Deltour *et al.*, 1996; Rifas *et al.*, 1997), 2) interferência nas ações de fatores de crescimento envolvidos na proliferação neural de células tronco, migração e diferenciação (Miller, 2006; Mooney *et al.*, 2006; Siegenthaler e Miller, 2006), 3) distúrbios em moléculas que medeiam interações célula-célula (L1, NCAM) e perda de suporte trófico (Wilkemeyer *et al.*, 2002; Miñana *et al.*, 2000), 4) desorganização na proliferação glial, diferenciação e funcionamento (Guerra *et al.*, 2001, 2006) e 5) ativação da sinalização molecular que controla a sobrevivência e a morte celular (privação de fatores de crescimento, stress oxidativo, sinalização apoptótica e ativação da caspase-3, supressão dos receptores NMDA glutamatérgicos e GABA_A, induzida pela excitotoxicidade) (Guerra *et al.*, 1994; Pascual *et al.*, 2003; Olney, 2004; Thomas *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2005).

A neurotoxicidade do etanol parece ser mediada, ao menos em parte, pela combinação do bloqueio de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), da hiperativação dos receptores GABA_A e da ativação da caspase-3 (Olney *et al.*, 2002; Olney 2004; Nowoslawski *et al.*, 2005).

A ativação da caspase-3, que gera as alterações citológicas que caracterizam a apoptose induzida pelo etanol, é determinada pela expressão dos genes *bax* da família Bcl-2 que regula a morte celular programada no desenvolvimento do sistema nervoso (Chiesa *et al.*, 2005; Nowoslawski *et al.*, 2005). Estudos recentes vêm demonstrando que camundongos *knockout* deficientes na expressão dos genes *bax* não apresentam a apoptose induzida por etanol (Heaton *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2003).

A magnitude dos efeitos teratogênicos do álcool vai depender e variar em função de fatores como idade dos indivíduos expostos, da intensidade, da frequência e da duração das exposições, além de fatores genéticos (Chiodo *et al.*, 2010, Burden *et al.*, 2005, Maier e West, 2001; Hannigan e Berman 2000; Klintsova *et al.* 2000; Riley e McGee, 2005). Fatores ambientais como a condição sócio-econômica, os fatores nutricionais e o aumento do estresse também podem interferir com os efeitos teratogênicos do álcool (Welch-Carre, 2005; Riley e McGee, 2005; Hannigan *et al.*, 2007).

Além dos fatores acima mencionados, o período de exposição irá determinar quais estruturas em desenvolvimento serão afetadas e quão severamente elas serão afetadas. Conseqüentemente, nem todos os indivíduos expostos a quantidades similares de etanol durante a gestação terão as mesmas sequelas. Alguns indivíduos poderão ter diversos sistemas afetados severamente enquanto outros não apresentarão efeitos aparentes (Riley e McGee, 2005).

A exposição pré-natal ao álcool durante o primeiro trimestre de gestação interfere com a migração, a proliferação e a organização celular cerebral tanto em humanos como em roedores (Cook *et al.*, 1990; Miller; 1996). Aproximadamente duas semanas após a fertilização em humanos, ocorre a gastrulação. Durante este processo ocorre a formação de 3 folhetos embrionários: ectoderma, endoderma e mesoderma. Na terceira semana de gestação, algumas células do mesoderma induzem o ectoderma a dobrar-se e formam-se então duas “dobras” ao longo da linha média do embrião. Os topos destas “dobras” curvam-se um em direção ao outro até se encontrarem e formarem o tubo neural. As células originadas da junção das duas dobras são chamadas de células da crista neural. Pesquisadores têm estudado extensivamente as células da crista neural pois acreditam que estas sejam particularmente sensíveis aos efeitos do etanol. O foco tem sido as chamadas células craniais da crista neural, que desenvolvem, entre outras estruturas, cartilagens faciais e ossos. Os efeitos deletérios do etanol durante este período do desenvolvimento parecem ser a causa mais provável das alterações craniofaciais encontradas em indivíduos expostos ao etanol durante o desenvolvimento (Goodlet e Horn, 2001). As dismorfias faciais aparecem apenas quando altas concentrações sanguíneas de etanol ocorrem durante o período de gastrulação (Sulik, 2005). De fato, camundongos expostos durante o período equivalente ao primeiro trimestre em humanos podem apresentar severas malformações faciais e cerebrais (Kotch e Sulik, 1992). Camundongos expostos ao álcool no sétimo (E7) ou oitavo (E8) dia embrionário (Sulik, 2005) e macacos do velho mundo expostos ao álcool no décimo nono (E19) ou vigésimo (E20) dia embrionário (Astley *et al.*, 1999) exibem dismorfias faciais. A intensidade destas malformações poderá incluir a presença de lábio leporino uni ou bilateral, nariz e região maxilar pequenos, fenda facial medial e ausência de narinas (Riley e McGee, 2005).

Sabe-se que o cérebro é particularmente sensível aos efeitos neurotóxicos do etanol durante o período de intenso crescimento e sinaptogênese do sistema nervoso central conhecido como *brain growth spurt* (Hamre e West, 1993; Moore *et al.*, 1999, Ikonomidou *et al.*, 2000). Este período ocorre nos primeiros dias de vida pós-natal de roedores (até o décimo dia de vida- P10) e em humanos durante o último trimestre de gestação (Ikonomidou *et al.*,

2000; Goodlett e West, 1992; Dobbing e Sands, 1979). Desta forma, roedores expostos ao álcool durante este período apresentam sintomas comparáveis aos encontrados em humanos como perda de massa cerebral e perda neuronal no cerebelo e no hipocampo (West *et al.*, 1986, Bauer-Moffett e Altman, 1977, Goodlett *et al.*, 1990, Ryabinin *et al.*, 1995).

Tomados em conjunto, estes dados evidenciam o tecido nervoso como uma das estruturas mais sensíveis aos efeitos teratogênicos do etanol, o qual produz um amplo espectro de defeitos neurológicos e comportamentais (Hannigan e Armant, 2000; Spohr *et al.*, 2007; Welch-Carre, 2005).

Apesar das características faciais serem os sintomas mais evidentes em indivíduos que foram expostos ao álcool durante a gestação, as conseqüências mais devastadoras são aquelas relacionadas às alterações cerebrais e alterações comportamentais (Riley e McGee, 2005). Durante o terceiro trimestre de gestação em humanos, estruturas como o cerebelo, o hipocampo e o córtex pré-frontal são particularmente sensíveis aos efeitos do etanol (Coles *et al.*, 1991; West e Pierce, 1986). De fato, roedores expostos ao etanol no período do desenvolvimento correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos reproduzem as alterações encontradas em humanos como microcefalia (Chen *et al.*, 2003) e perda neuronal no hipocampo e no cerebelo (West *et al.*, 1986, Bauer-Moffett e Altman, 1977; Goodlett *et al.*, 1990; Ryabinin *et al.*, 1995). A excessiva morte neuronal altera o desenvolvimento normal de redes neurais e pode levar a disfunções cognitivas e comportamentais tanto em humanos como em animais (Chen *et al.*, 2003).

De fato, crianças com FASD apresentam uma variedade de alterações cognitivas e comportamentais que podem variar de redução do coeficiente de inteligência, déficits de aprendizado e déficits motores a sutis alterações que são aparentes apenas em situações estressantes (Streissguth *et al.*, 1990, 1994; Mattson e Riley, 1998). Estudos demonstraram que indivíduos expostos ao etanol durante o desenvolvimento podem apresentar alterações histológicas em regiões como cerebelo, hipocampo e córtex (West *et al.*, 1981; Miller 1986, Thomas *et al.*, 1998; Sakata-haga *et al.*, 2002) e sugerem que estas histopatologias podem ser responsáveis pelas alterações comportamentais presentes em indivíduos com FASD (Ohta *et al.*, 2010).

Disfunções motoras como tremores, pouca firmeza, fraca coordenação dos olhos e das mãos, dificuldades ao andar e em relação ao equilíbrio (Mattson *et al.*, 1998; Roebuck *et al.*, 1998) também podem estar presentes em indivíduos previamente expostos ao álcool.

A FASD compreende um amplo espectro de alterações comportamentais que podem se manifestar em diferentes fases da vida do indivíduo (tabela 1). A severidade das alterações

varia de indivíduo para indivíduo e algumas podem alterar seu padrão de manifestação em função da idade do indivíduo (Banakar *et al.*, 2009).

Tabela 1. Características da FASD relacionadas a idade

Recém-nascidos	Início da infância/ pré-escola	Meio da infância	Adolescência e idade adulta
Dificuldades para dormir e se alimentar	Falante e amigável	Pequeno para idade	Características faciais podem desaparecer
Fraqueza, enjôo, irritabilidade e tremores	Acessos de fúria	Impulsividade e déficit de atenção	Baixo desempenho escolar
Choro excessivo	Hiperatividade	Pouca interação social	Julgamento prejudicado, problemas comportamentais
Hipersensibilidade a luz e som	Pequeno para idade	Dificuldade de aprendizado	Dificuldade de relacionamento
Convulsões	Atraso na fala	Déficits de linguagem	Maior propensão ao uso de substâncias de abuso e depressão
Atraso no desenvolvimento	Anormalidades em movimentos finos	Falta de organização	Dificuldade com atividades do dia-a-dia
	Retardo mental	Pensamento abstrato deficiente	Retardo mental
		Retardo mental	

Modificado de Banakar *et al.*, 2009

Estudos demonstram que roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento reproduzem alterações comportamentais encontradas em humanos expostos ao etanol durante o desenvolvimento. Dentre estas, podemos citar a hiperatividade, os déficits de atenção, os déficits de aprendizado e memória (Driscoll *et al.*, 1990), além de alterações nos níveis de ansiedade (Ohta *et al.*, 2010).

Numerosos mecanismos de ação do etanol que contribuem para seus efeitos deletérios no feto, particularmente no cérebro têm sido descritos. Contudo, esses mecanismos não são totalmente conhecidos e não explicam completamente as alterações decorrentes da exposição ao etanol durante o desenvolvimento (Goodlett e Horn, 2001).

Neste sentido, alguns autores vêm sugerindo que distúrbios na plasticidade neural podem ser responsáveis por algumas alterações causadas pelo etanol (Medina *et al.* 2003; Medina e Ramoa, 2005; Goodlett *et al.* 2005; Medina *et al.* 2006; Hannigan *et al.* 2007).

1.3 Neuroplasticidade

Plasticidade sináptica é a capacidade que o cérebro tem de modificar sua estrutura e função em resposta a experiências ou estímulos ambientais (Rapoport e Gogtay, 2008;

Hannigan *et al.*, 2007). Esta habilidade é essencial durante o desenvolvimento, quando os circuitos neurais são refinados (Lamprecht e Ledoux, 2004). O ambiente desempenha importante papel no desenvolvimento de circuitos neurais e existem inúmeras evidências da influência de atividades dependentes de experiência na formação dos padrões sinápticos (Hebb, 1949; Changeux e Danchin, 1976; Kandel *et al.*, 2000). Uma ativação repetitiva (em resposta a estímulos externos) de sinapses excitatórias aumenta a eficiência destas sinapses em diversas regiões cerebrais, fenômeno conhecido como LTP (*long term potentiation*) ou potenciação de longa duração. A LTP, um dos exemplos de plasticidade sináptica, apresenta diversas características que a tornam uma forte candidata para o mecanismo do armazenamento de memória de longo prazo: Ambos o LTP e a memória de longo prazo são acionados rapidamente, dependem da síntese de proteínas e são mantidos por longos períodos (Malenka e Nicoll, 1999).

Alguns autores sugerem que o aumento da ativação dos receptores NMDA imaturos pode levar a um aumento da plasticidade (Crair e Malenka, 1995; Crair, 1999). A atividade excitatória de neurônios glutamatérgicos é modulada também por interneurônios que têm como principal neurotransmissor o GABA e promovem uma importante sinalização inibitória para o desenvolvimento de redes neurais (Zhang, 2006). Adicionalmente, estudos sugerem que a neurotrofina BDNF influencia na liberação da GABA promovendo uma mobilização dos canais de cálcio pré-sinápticos próximo aos sítios de liberação das vesículas (Woo e Lu, 2006). Desta forma, uma supra ou infra-regulação dos canais de cálcio em neurônios glutamatérgicos ou gabaérgicos parece ser um mecanismo central para neuroplasticidade (Rapoport e Gogtay, 2008).

Os mecanismos moleculares envolvidos com a plasticidade adaptativa/compensatória, que é a capacidade do cérebro se recuperar ou readaptar a danos (Rapoport e Gogtay, 2008), ainda não são totalmente conhecidos. A maioria das estruturas cerebrais durante o desenvolvimento requer modificações na expressão gênica e produção de proteínas (Lamprecht e Ledoux, 2004). Alguns estudos tem demonstrado que a cascata de sinalização envolvendo o segundo mensageiro AMPc, a AMPc/Ca⁺⁺ e a proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺ (CREB) é importante para diversos processos relacionados a plasticidade neuronal como a dominância ocular (Mower *et al.*, 2002; Beaver *et al.*, 2001; Pham *et al.*, 1999), o LTP, o aprendizado e a memória (Frank e Greenberg, 1994; Finkbeiner *et al.*, 1997; Lamprecht, 1999).

Alguns fatores como influxo de cálcio em neurônios pós-sinápticos, alterações morfológicas nas espinhas dendríticas e alterações no citoesqueleto também estão relacionados

ao processo de neuroplasticidade (Lamprecht e Ledoux, 2004). Em relação mais especificamente à via que envolve AMPc/Ca⁺⁺ (CREB), sabe-se que o CREB pode ser ativado segundos ou minutos após a estimulação externa via aumento intracelular de AMPc ou de cálcio (Ginty *et al.*, 1993; Bacsikai *et al.*, 1993). O aumento intracelular de cálcio ativa o CREB via proteína quinase IV Ca⁺⁺/calmodulina-dependente (CaMKIV) (Ghosh e Greenberg 1995; Bito *et al.*, 1996). A ativação do CREB pelo cálcio pode ser mediada pela translocação da calmodulina do citoplasma para o núcleo (Deisseroth *et al.*, 1998).

Posteriormente ao aumento nos níveis de AMPc, as subunidades catalíticas e regulatórias da proteína quinase A (PKA) rapidamente se dissociam e a subunidade catalítica se transloca para o núcleo onde fosforila o CREB no sítio serina-133 (Bacsikai *et al.*, 1993). A fosforilação do sítio serina-133 é considerado um evento crítico que medeia o início da transcrição (Gonzalez *et al.*, 1989). Após a fosforilação do CREB ocorre a formação de complexo CREB-CBF que pode recrutar a RNA polimerase II no sítio promotor para iniciar a transcrição (Kee *et al.*, 1996). A CBP é uma histona acetil transferase (HAT) que se liga a outra proteína P/CAF que também possui atividade HAT (Ogryzko *et al.*, 1996; Banister e Kouzarides, 1996). A HAT catalisa a acetilação de resíduos lisina localizados dentro dos aminoácidos terminais das histonas. A acetilação neutraliza cargas que medeiam interações DNA-histonas. O complexo CREB-CBP-P/CAF pode desta forma induzir acetilações que enfraquecem as interações DNA-histonas e conseqüentemente facilitam a formação do complexo pré-iniciação na região promotora de genes de expressão imediata (IEGs) (Lamprecht, 1999).

Estudos têm demonstrado evidências que a via de sinalização envolvendo GMPc pode promover plasticidade sináptica e consolidação da memória, em parte pela ativação da cascata de sinalização MEK/ERK/CREB, uma cascata de sinalização envolvida em processos de consolidação de memória (Atkins *et al.*, 1998; Schafe *et al.*, 2000; Josselyn *et al.*, 2001). A síntese de GMPc é catalisada pela guanilato ciclase (GC) que converte guanosina trifosfato (GTP) a GMPc. O GMPc produzido ativa a proteína quinase G (PKG), um dímero que consiste de uma unidade catalítica e uma regulatória, com a unidade regulatória bloqueando os sítios ativos da unidade catalítica. O GMPc se liga nos sítios da unidade regulatória da PKG e ativa a unidade catalítica possibilitando a fosforilação de seus substratos. Ao contrário da ativação de outras proteínas quinases, como a PKA, a PKG é ativada sem que haja a dissociação das unidades catalíticas e regulatórias (Reneerkens *et al.*, 2009; Francis e Corbin, 1999). Estudos demonstram que a PKG pode ativar o CREB diretamente, através de fosforilação que ocorre no mesmo sítio de fosforilação da PKA (serina-133) (Lu *et al.*, 1999),

ou indiretamente pela via de MAP quinases. A PKG pode fosforilar a MEK (proteína quinase regulada por sinal extracelular) que por sua vez fosforila a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que fosforila o CREB (Ota *et al.*, 2008).

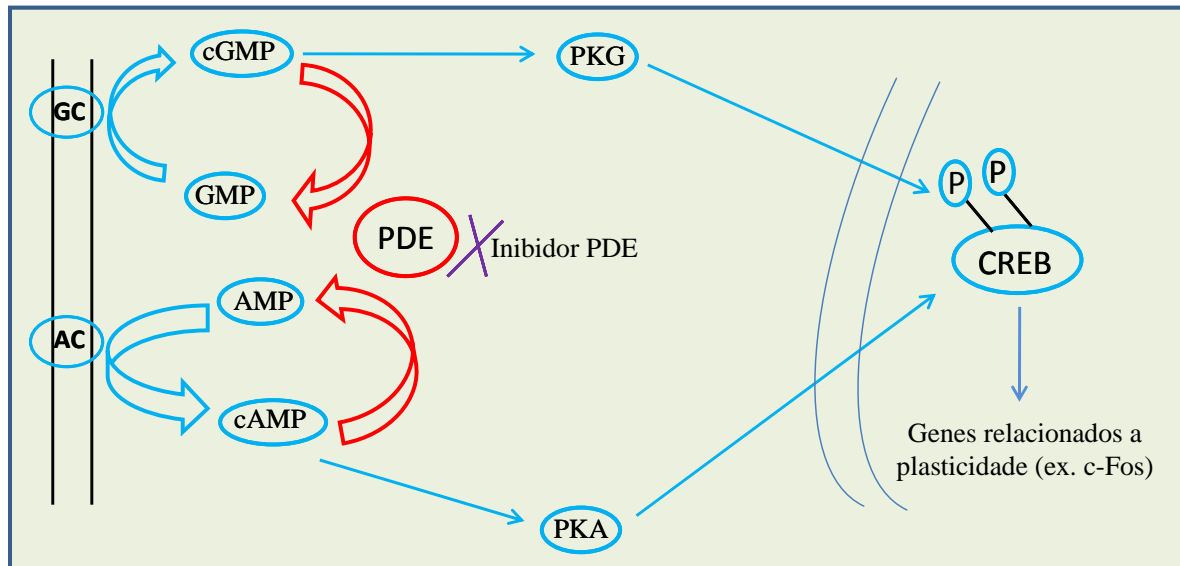


Figura 1. Representação esquemática da cascata de ativação do CREB via AMPc e GMPc. Cascata via AMPc: O influxo de Ca^{++} na célula, leva a ativação do complexo cálcio/calmodulina e ativação da enzima adenilato ciclase (AC) e geração de AMPc. O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), a qual fosforila o elemento de resposta dependente de AMPc/ Ca^{++} (CREB). As fosfodiesterases (PDE) hidrolizam o AMPc em AMP, interrompendo a cascata que levaria a ativação da PKA, posterior fosforilação do CREB e transcrição de genes relacionados a plasticidade. (Reneerkens *et al.*, 2009 e Bender e Beavo, 2006). Cascata via GMPc: O GMPc é gerado de via guanilato ciclase que é estimulada pelo óxido nítrico (Murad *et al.*, 1978). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG), posterior fosforilação do CREB e transcrição de genes relacionados a plasticidade (Reneerkens *et al.*, 2009). Modificado de Medina, 2010.

Os níveis de AMPc e GMPc celulares são controlados por enzimas que controlam suas taxas de degradação: as fosfodiesterases (ver figura 1).

1.3.1 Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas que regulam os níveis celulares de segundos mensageiros, AMPc e GMPc, controlando suas taxas de degradação. Existem 11 famílias de PDEs, cada uma com diversas isoformas (Bender e Beavo, 2006). As PDEs são agrupadas em famílias de acordo com a especificidade de seus substratos, que podem ser o AMPc ou o GMPc (Kakkar *et al.*, 1999) (ver Tabela 2). Estes nucleotídeos cíclicos desempenham um importante papel na sinalização intracelular (Son *et al.*, 1998; Chien *et al.*, 2003) e em processos de neuroplasticidade (Blokland *et al.*, 2006). As PDEs se diferenciam por suas estruturas tridimensionais, propriedades cinéticas, formas de regulação, localizações intracelulares, expressões celulares e diferentes sensibilidades a inibidores. São enzimas

fosfohidrolases que catalizam seletivamente a hidrólise da ligação do fosfato cíclico da adenosina, no caso do AMPc e guanosina em relação ao GMPc (Bender e Beavo, 2006).

Tabela 2. Tipos de fosfodiesterases presentes no sistema nervoso e suas distribuições

Famílias PDEs	Localização	Substratos
PDE1	Córtex, hipocampo, tálamo, cerebelo, bulbo olfatório, <i>nucleus accumbens</i> e estriato	AMPc/GMPc
PDE2	Córtex, hipocampo, prosencéfalo, mesencéfalo, amígdala	AMPc/GMPc
PDE3	por todo cérebro	AMPc
PDE4	por todo cérebro	AMPc
PDE5	Córtex, hipocampo, cerebelo	GMPc
PDE7A	Córtex, hipocampo, bulbo olfatório e cerebelo	AMPc
PDE8B	Córtex, hipocampo, bulbo olfatório e mesencéfalo	AMPc
PDE9	Córtex, hipocampo, estriato, cerebelo, bulbo olfatório, amígdala e mesencéfalo	GMPc
PDE10	Córtex, hipocampo estriato, cerebelo e substância negra	GMPc

Estudos têm demonstrado que os inibidores da PDE melhoram processos relacionados à neuroplasticidade como a memória e o aprendizado em diversas espécies como camundongos (Bourtchouladze *et al.*, 2003), ratos (Goodlett e Peterson, 1995) e humanos (Blokland *et al.*, 2006). Os efeitos destes inibidores têm sido atribuídos a um aumento nos níveis de AMPc ou GMPc, os quais, por sua vez, podem ativar o fatores de transcrição como SRF e CREB levando à expressão de genes relacionados à plasticidade (Barad *et al.*, 1998; Blokland *et al.*, 2006; Medina, 2010).

Dentre os inibidores das PDEs destaca-se a Vinpocetina (etil apovincaminato), um alcalóide extraído da mirta, inibidor não específico da PDE1 (Medina, 2010). Os alcalóides da mirta são utilizados no tratamento da demência (Nicholson, 1990) e a Vinpocetina em particular possui propriedades farmacológicas como aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (Caravaggi *et al.*, 1977; Lacroix *et al.*, 1979), estimular o metabolismo cerebral (Lacroix *et al.*, 1979; Shibota *et al.*, 1982), modular a liberação de neurotransmissores (Rosdy *et al.*, 1976) e ainda possui propriedades anti-inflamatórias (Teixeira *et al.*, 1994; Medina, 2010).

As PDE1s são cálcio e cálcio-calmodulina dependentes e foram uma das primeiras famílias de PDEs a serem identificadas (Cheung, 1970). Receberam esta nomenclatura por

terem sido uma das primeiras famílias a ter o mecanismo de regulação identificado e também pelo fato de numa cromatografia de separação de membranas de tecidos em colunas aparecerem como o primeiro pico de atividade das PDEs (Bender e Beavo, 2006). Suas 3 isoformas PDE1A, PDE1B e PDE1C são expressas em diferentes tipos celulares em diferentes tecidos e regiões do organismo, inclusive no cérebro (Bender e Beavo, 2006). Dentre as PDEs presentes no cérebro, a PDE1A e a PDE1B correspondem a mais de 90% da atividade destas enzimas (Kakkar *et al.*; 1999). As PDE1s apresentam tanto AMPc como GMPc como substrato (Blokland *et al.*, 2006) e a principal característica que distingue esta família das outras é sua regulação pela Ca^{+} /calmodulina (CaM).

Outro inibidor das PDEs muito utilizado é o Rolipram. O Rolipram tem como substrato o AMPc, é um inibidor das PDEs4 (Bender e Beavo, 2006) e tem sua ação mediada pela cascata de sinalização AMPc/PKA/P-CREB. Os inibidores da PD4 têm sido utilizados para aumentar os níveis de AMPc cerebral (Monti *et al.*, 2006). A PDE4 é a maior família de PDEs e está presente em diversos órgãos e tecidos do organismo, inclusive no cérebro, onde estão relacionadas, dentre outros processos, com o controle de humor (Beavo, 1995). Um grande número de inibidores PDE4 têm sido desenvolvidos com o objetivo de obter agentes terapêuticos. O inibidor típico da PDE4 é o Roplipram, o qual foi originalmente desenvolvido pelo grupo farmacêutico Schering AG como um possível agente antidepressivo (Wachtel, 1982). Posteriormente, outros autores desenharam seus estudos baseados nas propriedades antidepressivas do Rolipram (Bobon *et al.*, 1988; Fleischhacker *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1991).

Modelos animais demonstram que o tratamento com Rolipram é eficiente em restaurar danos de processos relacionados à plasticidade. Roedores tratados com Rolipram apresentam melhora no desempenho em testes de aprendizado e memória em diversas circunstâncias, como no modelo de estudo para síndrome de Rubinstein-Taybi (Nagakura *et al.*, 2002, Bourtchouladze *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003); no tratamento prévio com antagonistas do receptor NMDA (Zhang *et al.*, 2000) e em danos na memória espacial decorrentes da idade ou isquemia (Nagakura *et al.*, 2002).

1.3.2 O etanol afeta a neuroplasticidade

A neurotoxicidade é definida como modificações estruturais e funcionais do sistema nervoso resultantes da exposição a agentes químicos, biológicos e físicos (Philbert *et al.*, 2000). Estas alterações podem interferir em processos como a neuroplasticidade.

A ingestão de álcool durante o desenvolvimento pode afetar a plasticidade neuronal gerando alterações no desenvolvimento cerebral e alterações comportamentais. Estudos em roedores demonstraram que 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. A exposição precoce ao etanol promoveu também uma redução das subunidades NR1, NR2A e NR2B de receptores NMDA na área do córtex somatossensorial que representa as vibrissas de ratos (Rema e Ebner, 1999), além de uma diminuição do tamanho desta área em ratos jovens e adultos que foram expostos precocemente ao etanol (Chappell *et al.*, 2007).

Ikonomidou e colaboradores demonstraram que roedores expostos ao etanol durante o período neonatal apresentaram ampla neurodegeneração (Ikonomidou *et al.*, 2000) e que estes efeitos do etanol são mais proeminentes durante o período de intensa sinaptogênese. É provável que os déficits cognitivos e neurocomportamentais encontrados em indivíduos expostos ao etanol possam ser associados a esta intensa neurodegeneração resultante da exposição ao etanol durante o período de intensa sinaptogênese (Maas *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado que a neurodegeneração causada pela exposição ao etanol é resultante da inibição de processos importantes para sobrevivência dependente de atividade e desenvolvimento de neurônios (Franklin e Johnson, 1992; Verhage *et al.*, 2000). A sobrevivência dependente da atividade de diferentes populações neuronais do sistema nervoso central depende de uma despolarização induzida pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio e de subsequente ativação de diversas cascatas de sinalização (Mennerick e Zorumski, 2000). O sistema de transdução mediado pelo AMPc é importante para sobrevivências destas diversas populações neuronais (D'Mello *et al.*, 1993; Meyer-Franke *et al.*, 1995, 1998; Hanson *et al.*, 1998; Reiriz *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2003). A adenilato ciclase (AC) é uma enzima que catalisa a conversão de ATP em AMPc e é um componente crucial da via de sinalização do AMPc. A AC possui duas isoformas, AC1 e AC8, que são estimuladas diretamente pelo cálcio e são potenciais sítios de interação entre o AMPc e as vias de sinalização relacionadas ao cálcio (Tang *et al.*, 1991; Cali *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1999; Schaefer *et al.*, 2000). Como mencionado anteriormente, a cascata de sinalização envolvendo o segundo mensageiro AMPc, AMPc/Ca⁺⁺ e proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca⁺⁺ (CREB) é importante para diversos processos relacionados a plasticidade e esta via pode ser particularmente sensível aos efeitos da exposição precoce ao etanol (Clements *et al.*, 2005; Maas *et al.*, 2005).

Estudos eletrofisiológicos *in vivo* mostraram que a exposição precoce ao álcool pode afetar a plasticidade neuronal na área do córtex somatossensorial que representa as vibrissas de ratos (Rema e Ebner, 1999) e no córtex visual de furão (Medina *et al.*, 2003; Medina e Ramoa, 2005). Existem evidências de que a exposição ao álcool durante o desenvolvimento pode alterar fatores chave desta cascata como os níveis de AMPc (Maas *et al.*, 2005) e a expressão de genes relacionados a plasticidade como o cFOS (Clements *et al.*, 2005).

Recentemente, Filgueiras e colaboradores demonstraram que o tratamento com Vinpocetina, um inibidor da fosfodiesterase (PDE) tipo 1, reverteu déficits de aprendizado e memória em ratos expostos ao etanol no período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Filgueiras *et al.* 2010). Furões expostos ao etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana exibem um prejuízo na plasticidade das colunas de dominância ocular que é revertido pela administração de inibidores da PDE (Medina *et al.* 2003; Medina e Ramoa 2005; Medina *et al.* 2006). O processo de formação das colunas de dominância ocular, que tem sido amplamente usado como um modelo para estudar os mecanismos envolvidos com a plasticidade neural, compartilha vários mecanismos com processos de aprendizagem e memória tais como: a necessidade de ativação dos receptores NMDA (Mower *et al.* 2002), do AMPc (Beaver *et al.* 2001) e da fosforilação do CREB (Mower *et al.* 2002).

Estes dados sugerem que alterações na plasticidade neural podem ser um mecanismo importante para os efeitos do etanol. Desta forma, é possível sugerir que outros efeitos deletérios do etanol possam ser amenizados pela utilização de inibidores das PDES.

1.3.3 Etanol, neuroplasticidade e hiperatividade

A hiperatividade é uma das alterações comportamentais mais frequentes em humanos e roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento (Dursun *et al.*, 2006). Os mecanismos e as alterações envolvidos com a hiperatividade não são totalmente conhecidos. Alguns autores têm sugerido que a hiperatividade pode ser associada, dentre outros fatores, à depleção do fator de transcrição SRF em neurônios dopaminérgicos (Parkitna *et al.*, 2010) ou estar relacionada a polimorfismos de receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos e em alguns casos colinérgicos e glutamatérgicos (Faraone *et al.*, 2005). Recentemente, um número crescente de trabalhos vem sugerindo que distúrbios na plasticidade neural podem ser responsáveis por alterações comportamentais como a hiperatividade (Rapoport e Gogtay, 2008; Jensen *et al.*, 2009; Heath e Picciotto, 2009). Brevemente, Rapoport e Gogtay

apresentam estudos realizados a partir de estudos de imagem os quais indicam que crianças com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) apresentam excessiva ativação do córtex parietal posterior, uma região importante para o controle da atenção. Em indivíduos TDAH, a ativação do córtex parietal direito durante tarefas de alerta e reorientação da atenção não está completamente madura na idade adulta, via que deveria ser desenvolvida durante a adolescência. Existem evidências também de plasticidade induzida por treino da ativação desta região. Também são encontradas alterações morfológicas (diminuição da espessura) no córtex, além de diminuição do volume cerebelar, uma estrutura classicamente relacionada ao controle motor. Contudo, estudos recentes de lesão e estudos de imagem cerebelar demonstraram que alterações nesta região podem estar relacionadas com déficits de funções cognitivas e emocionais. Os hemisférios cerebelares podem ser plásticos, apresentando respostas estado-específico e aparecem como possíveis alvos para intervenção clínicas para pacientes TDAH.

Heath e Picciotto (2009) baseados em dados epidemiológicos que demonstram uma correlação entre a exposição ao tabaco durante o desenvolvimento e os déficits em processos sensoriais e desordens neuropsiquiátricas como o déficit de atenção e a hiperatividade; além de dados que relatam que a exposição a nicotina durante o desenvolvimento pode resultar em alterações nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios como resultado de uma plasticidade sináptica aberrante; sugerem que receptores nAChR são críticos para o estabelecimento e refinamento da eficiência de *loops* corticotalâmicos e talamocorticais durante períodos críticos do desenvolvimento e que a interrupção deste processo pela exposição à nicotina pode resultar em alterações comportamentais e desregulações persistentes do processo sensorial.

Jensen e colaboradores (2009) avaliaram os componentes envolvidos na sinapse, na transmissão e na plasticidade glutamatérgica, tais como as células piramidais CA1 e CA3, além das subunidades NR1, NR2A e NR2B dos receptores NMDA de ratos SHR (modelo animal validado para estudo de TDAH) adultos. Dentre os resultados obtidos, foi demonstrado que os animais SHR apresentaram uma redução na transmissão sináptica e uma predominância funcional da subunidade NR2B, característica dos estágios iniciais do desenvolvimento destas sinapses. Jensen e colaboradores (2009) sugerem que alterações nas sinapses glutamatérgicas podem ser um dos mecanismos envolvidos com as alterações comportamentais encontradas em ratos SHR e em humanos TDAH.

Interessantemente, apesar de evidências recentes de que a hiperatividade também está associada a alterações na plasticidade neural (Rapoport e Gogtay, 2008; Jensen *et al.*, 2009;

Heath e Picciotto, 2009), não temos conhecimento de estudos que tentem reverter este distúrbio comportamental decorrente da exposição precoce ao etanol. Desta forma, este estudo tem como objetivo verificar se a administração de inibidores das fosfodiesterases amenizam ou reverterem a hiperatividade de camundongos expostos ao álcool no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação em humanos.

2 OBJETIVOS

- Verificar se a administração de Vinpocetina, inibidor da fosfodiesterase tipo 1 (PDE1) ou Rolipram, inibidor da fosfodiesterase tipo 4, reverte ou ameniza a hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação humana.

- Avaliar o efeito destes inibidores sobre sinalizadores celulares como AMPc.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para este trabalho foram utilizados camundongos Suíços, criados e mantidos no biotério de camundongos do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (escuro a partir das 14 horas), com temperatura mantida em torno de 21° C e com livre acesso à água e comida. Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (protocolo #: CEUA/040/2010) e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos E.U.A.

3.2 Estudo 1 - Efeito da Vinpocetina em reduzir a hiperatividade em um modelo de exposição ao etanol durante o período neonatal de camundongos

3.2.1. Formação dos grupos experimentais

Após o nascimento as ninhadas eram separadas em ninhadas etanol (ETOH) ou salina (SAL). No segundo (PN2), quarto (PN4), sexto (PN6) e oitavo (PN8) dias de vida pós-natal, os animais ETOH recebiam injeções intraperitoneais de etanol (5g/Kg em solução salina a 25%) enquanto que os animais SAL recebiam um volume equivalente de salina. Ao completarem 21 dias de vida (PN21) os animais eram desmamados e separados por sexo. Os irmãos do mesmo sexo permaneciam juntos até P30, quando recebiam o tratamento com Vinpocetina (VP), na concentração de 10 ou 20mg/Kg, diluída em DMSO (dimetilsulfóxido) ou somente DMSO e posteriormente eram submetidos a teste comportamental para avaliar atividade locomotora.

Foram utilizados para este estudo, 149 camundongos Suíços (79 machos e 70 fêmeas) de 18 ninhadas.

Desta forma, este estudo requereu 6 grupos experimentais:

Grupo exposto ao Etanol e a Vinpocetina 10 (ETOH+VP 10)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de etanol, 5g/Kg em solução salina a 25% a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

No dia do teste comportamental, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Vinpocetina, 10mg/Kg, diluída em DMSO 4 horas antes do teste.

Grupo exposto ao Etanol e a Vinpocetina 20 (ETOH+VP 20)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de etanol, 5g/Kg em solução salina a 25% a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

No dia do teste comportamental, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Vinpocetina, 20mg/Kg, diluída em DMSO 4 horas antes do teste.

Grupo exposto ao Etanol e ao DMSO (ETOH+DMSO)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de etanol, 5g/Kg em solução salina a 25% a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

Em PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de DMSO, de acordo com o peso corporal, 4 horas antes do teste comportamental.

Grupo exposto a SALINA e a Vinpocetina 10 (SAL+VP 10)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de salina, de acordo com o peso corporal, a cada dois dias, no período neonatal de (PN2 a PN8).

Em PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Vinpocetina, 10mg/Kg, diluída em DMSO 4 horas antes do teste comportamental.

Grupo exposto a SALINA e a Vinpocetina 20 (SAL+VP 20)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de salina, de acordo com o peso corporal, a cada dois dias, no período neonatal de (PN2 a PN8).

Em PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Vinpocetina, 20mg/Kg, diluída em DMSO 4 horas antes do teste comportamental.

Grupo exposto a SALINA e ao DMSO (SAL+DMSO)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de salina, de acordo com o peso corporal, a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

No dia do teste comportamental, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de DMSO, de acordo com o peso corporal, 4 horas antes do teste comportamental.

A dose de etanol foi escolhida baseada em estudo anterior (Filgueiras *et al.*, 2009) que utilizou a mesma dose e gerou níveis de etanol em soro semelhantes aqueles encontrados em fetos humanos após a ingestão materna de doses moderadas a altas de etanol. (Eckardt *et al.*, 1998). O tratamento em dias alternados foi realizado a fim de reproduzir o consumo intermitente de etanol em humanos, o qual está associado a severos danos cognitivos e a déficits

comportamentais (Maier e West, 2001). As doses de Vinpocetina e o intervalo entre a administração da droga e o teste foram baseados em estudo prévio (Filgueiras *et al.*, 2010).

3.2.2 Taxa de sobrevivência

Foram realizados 2 estudos neste trabalho. No Estudo 1 foi avaliado o efeito da Vinpocetina em reduzir a hiperatividade de camundongos expostos ao etanol durante o período neonatal e no Estudo 2 (detalhado mais adiante) foi avaliado o efeito do Rolipram para o mesmo propósito. Previamente ao tratamento com os inibidores, foi calculada a taxa de sobrevivência dos animais, afim de verificar se a maioria dos animais sobreviveu ao tratamento neonatal. A taxa de sobrevivência foi calculada a partir da amostra total (animais do Estudo 1 + animais do Estudo 2). A taxa de sobrevivência foi obtida pela contagem de animais dos dois estudos das ninhadas ETOH e SALINA em PN2, ou seja, no dia da primeira injeção de etanol ou salina, e pela subsequente contagem de animais em PN30.

3.2.3 Peso corporal

Os animais foram pesados em dias alternados durante o período de exposição neonatal e no dia do teste. Uma vez que em camundongos neonatos é difícil a identificação do sexo dos animais, somente em PN30 consideramos o sexo para avaliação do peso corporal.

3.2.4 Teste comportamental

O teste de campo aberto (*open-field*) foi desenvolvido originalmente por Hall (1934) e é largamente utilizado para avaliar a ansiedade e a atividade locomotora (Matsuo *et al.*, 2010; Sansar *et al.*, 2010; Filgueiras *et al.*, 2009; Zubkov e Kulikov, 2009; Elliott *et al.*, 2005; Elliott e Grunberg, 2005; Choleris *et al.*, 2001). O campo aberto (CA) pode ser aplicado no estudo de comportamento das mais variadas espécies, desde baratas (Inozemtsev *et al.*, 1998) até camundongos (Tang *et al.*, 2002) e a forma como o CA será aplicado dependerá muito da espécie a ser estudada e do objetivo do trabalho. A arena do campo aberto utilizada neste trabalho (figura 2) consiste em uma caixa de polipropileno (36,6 x 30,4 x 17 cm) cujo fundo é dividido em 16 retângulos iguais (12 periféricos e 4 centrais). Os animais são colocados individualmente no centro da arena e podem explorar o ambiente livremente.

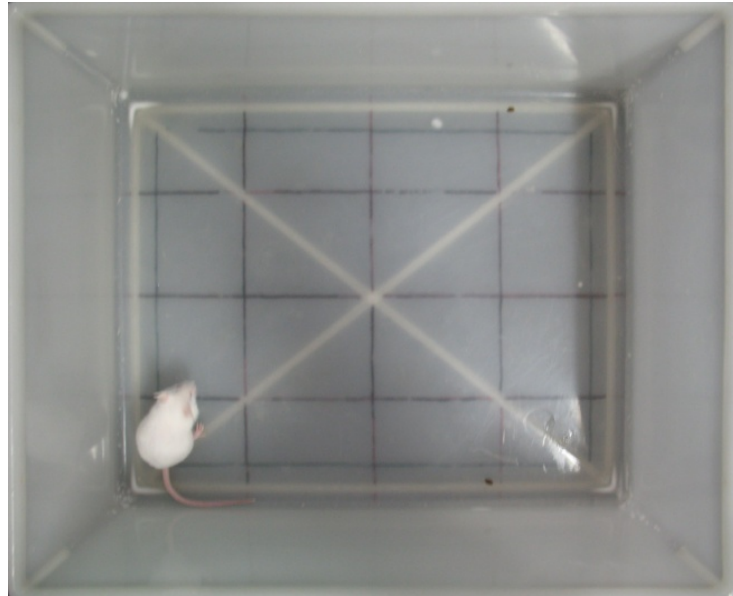


Figura 2. Foto em vista superior da arena do campo aberto.

Antes do início de cada teste, as gaiolas dos animais eram transportadas para a sala de teste onde os animais eram ambientados por 10 minutos. Para realização dos testes, os animais eram colocados sempre no centro da arena. A duração do teste era de 10 minutos. Após o término de cada teste, a arena era limpa com o intuito de eliminar excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados. Os testes eram realizados na fase escura, numa sala com proteção acústica e gravados para análise posterior.

Variáveis quantificadas

A partir das imagens gravadas, a ambulação foi quantificada com base no número de retângulos cruzados pelo animal ao longo do teste. Para tal, foi utilizado o programa ACC OpF HB Avaliação Computadorizada de Comportamento (desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia/DCF/IBRAG/UERJ) utilizado para avaliação comportamental do teste de campo aberto. Um retângulo foi considerado como cruzado toda vez que o animal colocava as quatro patas no retângulo. Foram quantificadas ambulação no centro (C), ambulação na periferia (Pe) e ambulação total (C+Pe).

Considerando que comparações entre as atividades no centro e na periferia podem ser influenciadas pelo fato do número de retângulos na periferia ser maior que o número de retângulos no centro, o número de retângulos cruzados no centro e na periferia foram divididos por 4 (C/4) e 12 (Pe/12) respectivamente. Para análise estatística o tempo total de teste (10 min) foi dividido em intervalos de 1 min.

3.2.5 Quantificação de etanol no soro dos animais

Foram medidas as concentrações de etanol no soro dos animais em PN4 em dois intervalos diferentes, 1 ou 2 horas após as injeções. Para tanto, foram administradas injeções de etanol 5,0 g/Kg ou salina nos neonatos como descrito acima. Após as injeções, os animais foram mortos, decapitados, e o sangue coletado em eppendorfs. O sangue foi centrifugado (2000 rpm, 5 min) para separação do soro e das células e posterior coleta de soro. Após a coleta do soro, com o auxílio de um kit enzimático (Pointe Scientific, INC., Canton, MI), foram feitas as reações e posterior leitura dos valores num espectrofotômetro a 340 nm. Estes valores foram utilizados para o cálculo das concentrações de etanol no soro destes animais.

Concentração de etanol (mg/dl) = (Absorbância da amostra/ Absorbância do standard) × concentração standard. A concentração do standard fornecido no kit era de 100 mg/dl.

3.2.6 Dosagem de AMPc

A técnica é constituída de 3 etapas: acúmulo de AMPc, separação e dosagem de AMPc, como descrito anteriormente (De Mello *et al.*, 1982; Gilman, 1970; Matsuzawa *et al.*, 1975). Brevemente:

1ª etapa - Acúmulo de AMPc

Após os testes, 60 animais (pelo menos 7 por grupo) foram sacrificados por deslocamento cervical. O cérebro dos animais foi dissecado, o terço anterior do córtex cerebral e o hipocampo foram coletados e posteriormente incubados por 1h a uma temperatura de 37°C em MEM (*minimum essential medium*) com Rolipram 0,5 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Finalizada a incubação, a reação foi interrompida pela adição de TCA (ácido tricloro acético) numa concentração final de 10%. As amostras foram recolhidas em tubos falcon e congeladas (-45°C) para posterior purificação e quantificação.

2ª etapa - Separação de AMPc

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e o ensaio realizado em triplicata. Foram acrescentados 50 µl de [³H]-AMPc a cada amostra, os tubos foram centrifugados e o líquido dos tubos vertidos em colunas de vidro com alta afinidade por AMPc previamente lavadas 3× com HCl e 2× com água destilada. Foram pipetados 6 ml de água destilada em cada coluna para “posicionar a amostra na resina”. Após essa primeira lavagem, foram pipetados 3 ml de água destilada em cada coluna e posicionada uma estante contendo tubos de ensaio abaixo das colunas de vidro, para recolhimento do material que

escoou. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Finalizada esta etapa, foram pipetados 100 µl de cada amostra recolhida em filtros de celulose e 50µl de AMPc [³H]-AMPc em um filtro, o *input*. Os filtros foram levados a estufa para secar numa temperatura de 100°C de 10 a 15 min, remanejados para *vials* contendo líquido cintilográfico e lidos posteriormente no cintilador. Os tubos que apresentaram os maiores valores de leitura foram separados para a próxima etapa da técnica.

3ª etapa - Dosagem

Esta etapa foi realizada em duplicata. Foram pipetados 105 µl de cada amostra em seus respectivos tubos e construída uma curva padrão de 7 pontos. Para tanto, cada tubo, da curva e das amostras, recebeu 50 µl de acetato de sódio. Referente a curva padrão temos: AMPc frio - estocado (não radioativo) em duas diluições: 1:10 (180 µl água milique + 20 µl de AMPc) e 1:2 (100 µl água milique + 100 µl de AMPc) e não diluído; AMPc quente-radioativo e Solução F = PKA (proteína kinase A) + BSA (*serum bovine albumin*) + Água milique. Desta forma, foram preparados os seguintes tubos:

- 1 e 1' - 5 µl BSA + 20 µl AMPc quente
- 2 e 2' - 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F
- 3 e 3' - 50 µl AMPc frio (1:10) + 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F
- 4 e 4' - 30 µl AMPc frio (1:2) + 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F
- 5 e 5' - 50 µl AMPc frio (1:2) + 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F
- 6 e 6' - 50 µl AMPc frio não diluído + 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F
- 7 e 7' - 75 µl AMPc frio não diluído + 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F

Os tubos das amostras receberam 20 µl AMPc quente + 25 µl da solução F.

Posteriormente a este preparo, os tubos foram vortexados e levados à geladeira para incubação de 1 h e 40 min. Durante a incubação, filtros Millipore de AMPc (filtros que apresentam afinidade pela ligação AMPc-PKA), foram umedecidos em tampão fosfato (pH = 6). Ao término da incubação a reação foi interrompida pela adição de tampão fosfato (pH = 6). As amostras foram vortexadas e vertidas em seus respectivos filtros (posicionados sobre uma bomba a vácuo). Ao término desta etapa, os filtros foram levados à estufa para secagem numa temperatura de 100°C onde permaneceram por 10 min. Retirados da estufa, os filtros foram remanejados para *vials* contendo líquido cintilográfico e lidos posteriormente em cintilador.

Após a leitura dos filtros da etapa de dosagem do AMPc (valores em CPMA), foi construída uma curva padrão; e a partir desta curva foram calculados os valores de AMPc

(pmol) das amostras. Destes valores (pmol), foi subtraído 0,5 (referente a quantidade de AMPc quente adicionado à amostra, 50 µl numa concentração de 0,5 pmoles). O total dessa subtração é referente ao tubo do qual foram recolhidos 105 µl, originários de um tubo cujo total é de 3 ml (selecionado na etapa de separação por apresentar maior valor de leitura). Para estimar o valor referente ao tubo de 3 ml, este valor (pmol) foi multiplicado por 30. Contudo, ainda durante a etapa de separação, foram recolhidos 3 tubos de cada amostra e utilizado apenas aquele que apresentou o maior valor de leitura. Logo, o valor de leitura de apenas um tubo não representa o total da amostra, apenas uma porcentagem desta. Portanto, a partir dos valores de leitura do *input*, foi calculado o percentual referente ao valor do tubo que apresentou a maior leitura (valor *input* = 100%; valor de leitura do tubo = x%). Calculado o percentual, foi estimado, a partir de uma regra de três, o total, considerando que toda amostra tenha sido recolhida em apenas um tubo (o de maior valor de leitura). Baseado no valor em pmol referente a x% da amostra, calculamos o valor referente a 100%. Desta forma temos as seguintes etapas:

- construção da curva padrão;
- cálculo da média dos valores de leitura (etapa de dosagem);
- cálculo do valor em pmol a partir da curva padrão;
- subtração de 0,5 deste valor;
- multiplicação deste valor por 30;
- cálculo da porcentagem referente a tubo de 3 ml;
- cálculo da porcentagem considerando que toda amostra tenha sido recolhida em apenas um tubo.

Os níveis de AMPc foram normalizados pela quantidade de proteína presente nos tecidos. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951).

3.2.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e erros padrão. Visando minimizar efeitos de ninhada (Wainwright, 1998), para as análises foi considerado o peso médio dos machos e o peso médio das fêmeas de cada ninhada. A única exceção foi a análise do peso corporal no período neonatal quando foi considerado o peso médio de cada ninhada sem considerar o sexo dos animais.

Para avaliação do peso corporal no período neonatal foi realizada uma ANOVA de repetição (ANOVA_r). TRATAMENTO NEONATAL (salina ou etanol) foi utilizado como fator e DIA foi considerado fator de repetição. Para avaliação do peso corporal no dia do teste foi utilizada uma ANOVA_u e foram utilizados como fatores SEXO e TRATAMENTO NEONATAL. Para ambos os casos, diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando FPLSD (*Fisher Protected Least Significant Difference*) como teste *post-hoc*.

Para quantificação de etanol no soro foi utilizada uma ANOVA_u. O INTERVALO da aplicação das injeções (1 h ou 2 hs) e o TRATAMENTO (salina ou etanol) foram utilizados como fatores da análise.

Para as medidas de ambulação e para análise dos níveis de AMPc em cada região (córtex ou hipocampo) TRATAMENTO NEONATAL, TRATAMENTO EM P30 (DMSO ou Vinpocetina) e SEXO foram os fatores utilizados. Diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando FPLSD como teste *post-hoc*. Para as medidas de ambulação INTERVALO foi utilizado como fator de repetição.

As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3.3 Estudo 2 - Efeito do Rolipram em reduzir a hiperatividade em um modelo de exposição ao etanol durante o período neonatal de camundongos

3.3.1 Formação dos grupos experimentais

A formação dos grupos experimentais foi realizada seguindo os mesmos critérios do estudo anterior. Brevemente, as ninhadas eram expostas ao etanol (5g/Kg em solução salina a 25%) ou à salina via intraperitoneal durante o período neonatal (PN2, PN4, PN6 e PN8), em PN21 ocorria o desmame e separação de machos e fêmeas. Em P30, os animais recebiam tratamento com o inibidor da fosfodiesterase Rolipram (ROL) diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) ou somente DMSO e posteriormente eram submetidos ao teste comportamental.

Foram utilizados para este estudo, 160 camundongos Suíços (86 machos e 74 fêmeas) de 19 ninhadas.

Para este estudo foram requeridos 4 grupos experimentais:

Grupo exposto ao Etanol e ao Rolipram (ETOH+ROL)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de etanol, 5g/Kg em solução salina a 25% a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

No dia do teste, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Rolipram, 0,5 mg/Kg, diluído em DMSO 2 horas antes do teste comportamental.

Grupo exposto ao Etanol e ao DMSO (ETOH+DMSO)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de etanol, 5g/Kg em solução salina a 25% a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

No dia do teste comportamental, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de DMSO, de acordo com o peso corporal, 2 horas antes do teste.

Grupo exposto a SALINA e ao Rolipram (SAL+ROL)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de salina, de acordo com o peso corporal, a cada dois dias, no período neonatal de (PN2 a PN8).

No dia do teste comportamental, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de Rolipram, 0,5 mg/Kg, diluído em DMSO 2 horas antes do teste comportamental.

Grupo exposto a SALINA e ao DMSO (SAL+DMSO)

Neste grupo os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de salina, de acordo com o peso corporal, a cada dois dias, no período neonatal (PN2 a PN8).

No dia do teste, PN30, os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de DMSO, de acordo com o peso corporal, 2 horas antes do teste comportamental.

A dose de Rolipram é a mesma já utilizada em estudo prévio (Monti *et al.*, 2006) e o intervalo entre a administração da droga e o teste foi baseado na meia vida da droga, 1-3 hs (Barad *et al.*, 1998).

3.3.2 Peso corporal

Os animais foram pesados em dias alternados durante o período de exposição neonatal e no dia do teste. Uma vez que em camundongos neonatos é difícil a identificação do sexo dos animais, somente em P30 consideramos o sexo para avaliação do peso corporal.

3.3.3 Teste comportamental

Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto nas mesmas condições do estudo anterior.

3.3.4 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e erros padrão. Visando minimizar a efeitos de ninhada (Wainwright, 1998), para as análises foi considerado o peso médio dos machos e o peso médio das fêmeas de cada ninhada. A única exceção foi a análise do peso corporal no período neonatal quando foi considerado o peso médio de cada ninhada sem considerar o sexo dos animais.

Para avaliação do peso corporal no período neonatal foi realizada uma ANOVA de repetição (ANOVA_r), foi utilizado TRATAMENTO NEONATAL (salina ou etanol) como fator e DIA foi considerado fator de repetição. Para avaliação do peso corporal no dia do teste, foi utilizada uma ANOVA e foram utilizados como fatores SEXO e TRATAMENTO NEONATAL. Para ambos os casos diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando FPLSD como teste *post-hoc*.

Para as medidas de ambulação, TRATAMENTO NEONATAL, TRATAMENTO EM P30 (DMSO ou Rolipram) e SEXO foram os fatores utilizados. Diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando FPLSD como teste *post-hoc*. Para as medidas de ambulação INTERVALO foi utilizado como fator de repetição. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo 1 - Efeito da Vinpocetina em reduzir a hiperatividade em um modelo de exposição ao etanol durante o período neonatal de camundongos

4.1.1 Peso corporal no período neonatal e no dia do teste

A média de peso das ninhadas aumentou significativamente de PN2 a PN8 [ANOVA: $F(1,2; 18,7) = 600,6; P < 0,001$]. Durante este período não houve diferença de ganho de peso entre os animais injetados com etanol ou salina em nenhuma das idades (Tabela 3).

Tabela 3. Peso médio das ninhadas no Estudo 1.

	Peso médio das ninhadas (g)			
	PN2	PN4	PN6	PN8
SALINA	1,9 ± 0,9	2,7 ± 0,1	3,6 ± 1,6	4,6 ± 0,3
ETOH	2,1 ± 1,9	2,9 ± 0,1	3,8 ± 1,8	4,7 ± 0,2

Valores representam as médias ± EPM

No dia do teste, PN30, não houve diferença de peso entre os animais que receberam injeções de etanol (21,9 ± 0,6 gramas) ou salina (21,6 ± 0,6 gramas) durante o período neonatal [ANOVAu: $F(1; 35) = 0,1; P = 0,75$]. A média de peso dos machos das ninhadas (22,7 ± 0,6 gramas) foi significativamente maior que a média das fêmeas (20,8 ± 0,6 gramas) [ANOVAu: $F(1; 35) = 4,6; P < 0,05$]. Contudo, não houve interação entre SEXO e TRATAMENTO NEONATAL [ANOVAu: $F(1; 35) = 0,01; P = 0,94$].

4.1.2 Taxa de sobrevivência

A maioria dos animais sobreviveram as injeções de salina e etanol. As taxas de sobrevivência foram de 87,5% (n = 91) para os animais que receberam as injeções de etanol e 95,1% (n = 98) para os animais que receberam injeções de salina. Não houve diferença estatística entre as taxas de sobrevivência dos grupos (FPLSD: $P = 0,56$).

4.1.3 Quantificação de etanol no soro

Os níveis de etanol encontrados no plasma 1h e 2hs após as injeções (5g/Kg i.p.) foram de 316,2 ± 9,6 e 321,4 ± 6,5 mg/dL, respectivamente. Para os animais do grupo

controle, os valores encontrados foram $2,4 \pm 3,1$ e $7,0 \pm 4,7$ mg/dL, respectivamente 1h e 2 h após as injeções de salina. Os níveis de etanol foram maiores nos animais expostos a etanol quando comparados com os animais controle [ANOVAu: TRATAMENTO, $F = 215$; $P < 0,001$]. Os valores obtidos dos animais expostos ao etanol não variaram em função do intervalo após injeção (1 h ou 2 hs).

4.1.4 Medidas de ambulação

De modo geral, a ambulação na periferia ($89,5 \pm 3,7$ retângulos) foi significativamente maior do que no centro ($19,0 \pm 1,3$ retângulos) [ANOVAu, $F (1; 148) = 768$; $P < 0,001$]. Quando os valores foram divididos pelo número de retângulos da periferia ($7,5 \pm 0,3$) e no centro ($4,8 \pm 0,3$) da arena, essa diferença diminuiu, mas permaneceu significativa [ANOVAu, $F (1; 148) = 730$; $P < 0,001$].

Em relação a ambulação na periferia, não houve efeito do INTERVALO, o que indica que a ambulação na periferia não foi alterada ao longo do teste [ANOVAr, $F (6,1; 387,4) = 1,0$; $P = 0,42$]. Como indicado pela interação entre TRATAMENTO NEONATAL \times TRATAMENTO EM P30 [ANOVAr, $F (2; 63) = 3,3$; $P < 0,05$], a Vinpocetina reverteu a hiperatividade promovida pela exposição ao etanol no período neonatal de forma dose-dependente. Assim, os animais do grupo ETOH+DMSO apresentaram maior atividade que os animais dos grupos SAL+DMSO e ETOH+VP20, os quais não diferiram entre si (figura 3). Apesar de não haver diferença entre os grupos SAL+DMSO e ETOH+VP10 a ambulação dos animais do grupo ETOH+VP10 não diferiu significativamente da ambulação dos animais ETOH+DMSO. Não houve diferença entre machos e fêmeas. Resultados similares foram encontrados para ambulação total (centro+periferia; rANOVA: interação TRATAMENTO NEONATAL e TRATAMENTO EM P30 [$F (2; 62) = 3,6$; $P < 0,05$] (figura 4).

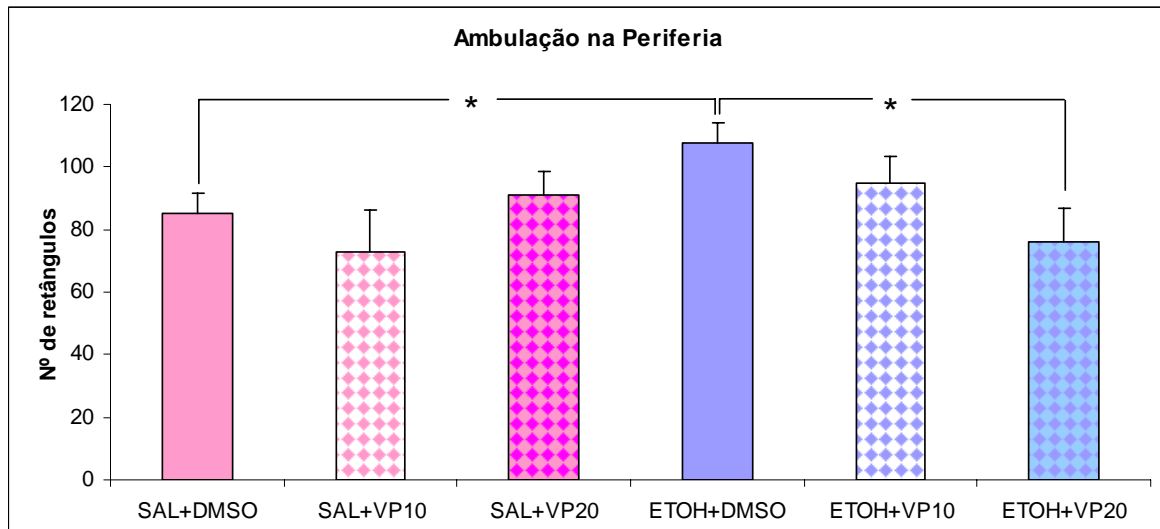


Figura 3. Médias (+EPM) da ambulação na periferia dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Vinpocetina 10mg/kg (VP10), 20mg/kg (VP20) ou veículo (DMSO) no dia do teste de campo de campo aberto. Notar que os animais do grupo ETOH+DMSO apresentaram uma hiperatividade locomotora quando comparados ao animais do grupo SAL+DMSO. Esta hiperatividade foi revertida de forma dose dependente pelo tratamento com Vinpocetina na dose de 20mg/Kg (ETOH+DMSO=ETOH+VP20). Teste FLSD: * P < 0,05.

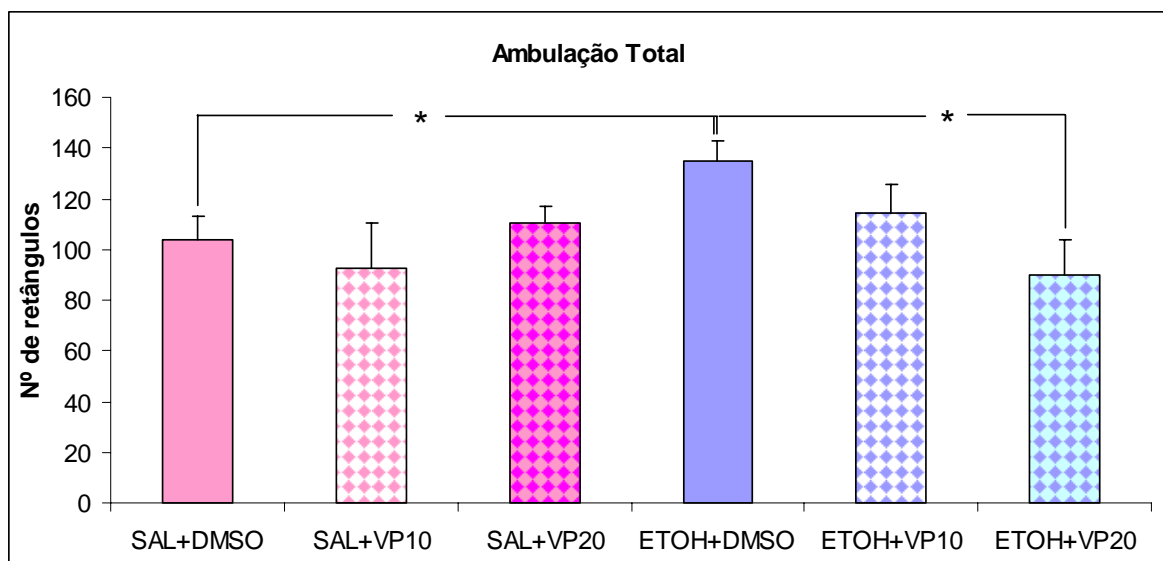


Figura 4. Médias (+EPM) da ambulação total no teste de campo aberto dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Vinpocetina 10mg/kg (VP10), 20mg/kg (VP20) ou veículo (DMSO) no dia do teste. Notar que os animais do grupo ETOH+DMSO apresentaram uma hiperatividade locomotora quando comparados ao animais do grupo SAL+DMSO. Esta hiperatividade foi revertida de forma dose dependente pelo tratamento com Vinpocetina na dose de 20mg/Kg (ETOH+DMSO=ETOH+VP20). Teste FLSD: * P < 0,05.

Conforme indicado pela ANOVA, a partir do segundo intervalo de tempo, houve um aumento de atividade no centro ao longo do teste para todos os grupos [INTERVALO, F (6,3; 393,1) = 3,3; P < 0,01] (figura 5). Não houve efeito de SEXO, EXPOSIÇÃO NEONATAL E TRATAMENTO EM P30 assim como não houve interações entre estes fatores.

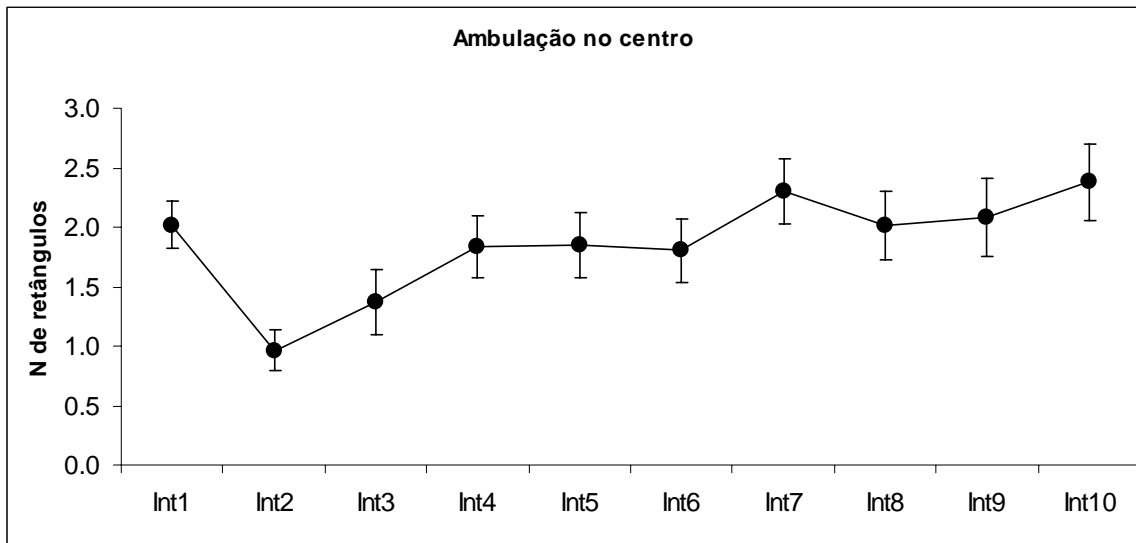


Figura 5. Médias (+EPM) da ambulação no centro campo aberto da amostra total ao longo dos intervalos de 1 minuto. Notar que a ambulação aumenta a partir do segundo intervalo de tempo (Int2).

4.1.5 Níveis de AMPc

O tratamento com Vinpocetina aumentou os níveis de AMPc no hipocampo [ANOVAu: $F(1; 21) = 69,8$; $P < 0,001$] e córtex cerebral [ANOVAu: $F(1; 21) = 43,8$; $P < 0,001$]. A exposição neonatal ao etanol reduziu significativamente os níveis de AMPc no hipocampo [ANOVAu, $F(1; 21) = 63,9$; $P < 0,001$], os quais foram restaurados pelo tratamento com Vinpocetina. Como indicado pela interação entre TRATAMENTO NEONATAL e TRATAMENTO EM P30 [ANOVAu: $F(1; 21) = 9,1$; $P < 0,01$], os níveis de AMPc no grupo ETOH+DMSO foram significativamente menores que os níveis observados nos grupos SAL+DMSO e ETOH+VP20; os quais não diferiram entre si (figura 6). Não houve diferença nos níveis de AMPc entre machos e fêmeas.

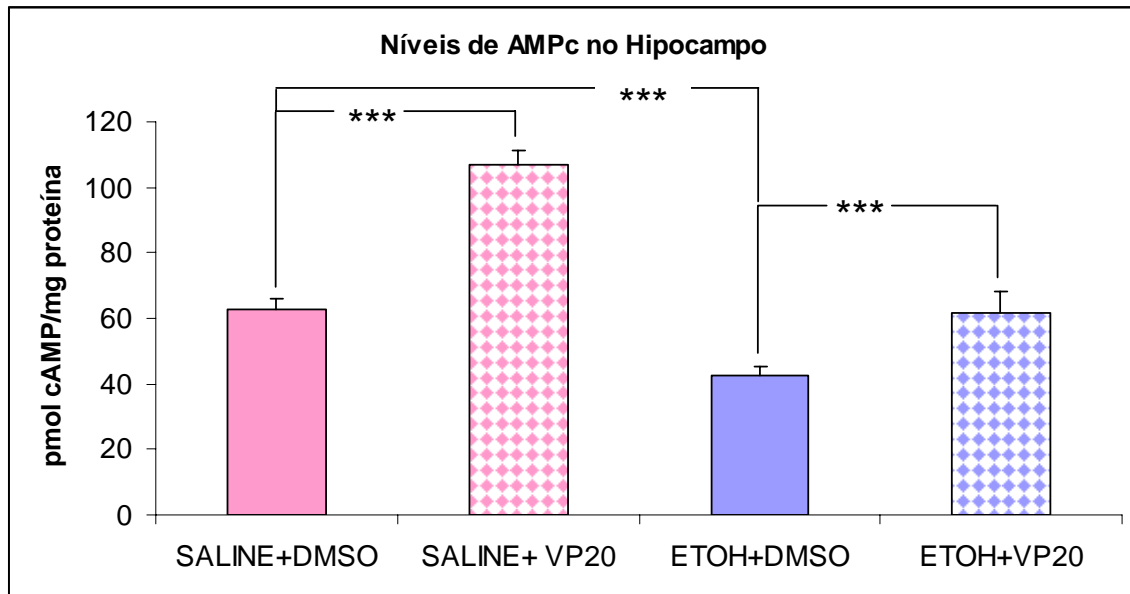


Figura 6. Médias (+EPM) dos níveis de AMPc no hipocampo de animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Vinpocetina 20mg/kg (VP20) ou veículo (DMSO) no dia do teste. Notar que o tratamento com Vinpocetina aumentou os níveis de AMPc (SALINE+DMSO < SALINE+VP20 e ETOH+DMSO < ETOH+VP20) e que os níveis de AMPc dos animais do grupo ETOH+DMSO foram menores que os níveis dos animais SAL+DMSO. Estes níveis foram restaurados pelo tratamento com Vinpocetina na dose de 20mg/Kg (ETOH+DMSO < ETOH+VP20 = SAL+DMSO). Teste FLSD: * P < 0,05.

No córtex cerebral, houve efeito do TRATAMENTO NEONATAL [ANOVAu: F (1; 21) = 7,0; P < 0,05], indicando que os níveis de AMPc dos animais expostos a salina (SAL+DMSO e SAL+VP20, amostra combinada) foram significativamente maiores que os níveis dos animais expostos ao etanol (ETOH+DMSO e ETOH+VP20 amostra combinada). Contudo não houve diferença entre ETOH+DMSO e SAL+DMSO quando estes grupos foram avaliados separadamente (figura 7). Adicionalmente, os níveis de AMPc do grupo ETOH+VP20 foram maiores que os níveis encontrados nos animais do grupo SAL+DMSO (figura 7). Não houve diferença nos níveis de AMPc entre machos e fêmeas.

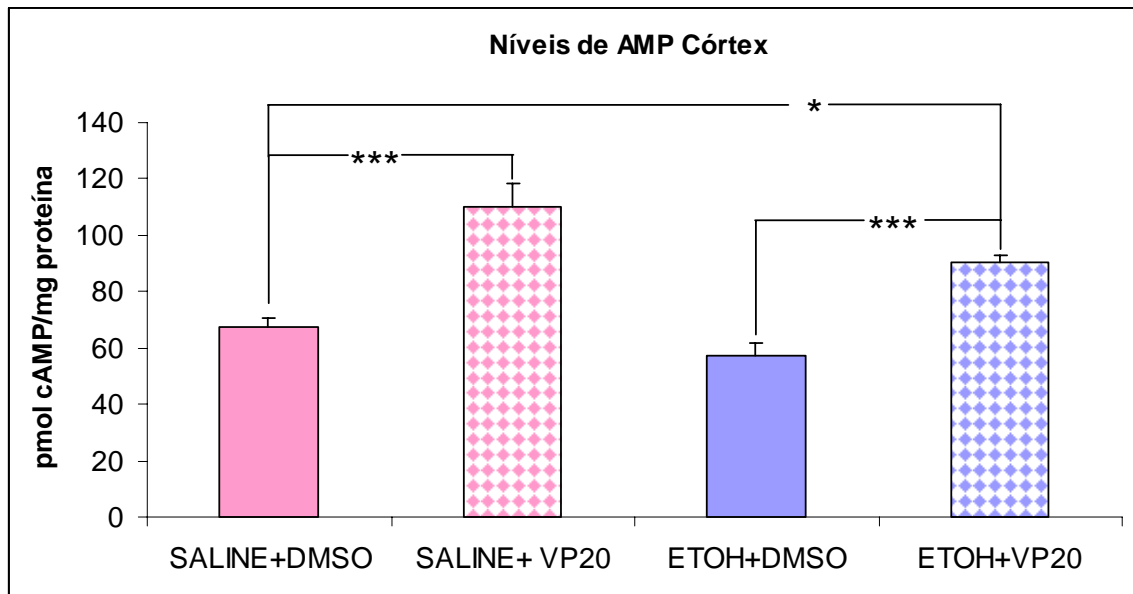


Figura 7. Médias (+EPM) dos níveis de AMPc no córtex de animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Vinpocetina 20mg/kg (VP20) ou veículo (DMSO) no dia do teste. Notar que, embora o tratamento com Vinpocetina tenha aumentado os níveis de AMPc (SALINE+DMSO < SALINE+VP20 e ETOH+DMSO < ETOH+VP20), os níveis de AMPc dos animais do grupo ETOH+DMSO não foram menores que os níveis dos animais SAL+DMSO. Teste FLSD: * P < 0,05; *** P < 0,001.

4.2 Estudo 2 – Efeito do Rolipram em reduzir a hiperatividade em um modelo de exposição ao etanol durante o período neonatal de camundongos

4.2.1 Peso corporal no período neonatal e no dia do teste

A média de peso das ninhadas aumentou significativamente de PN2 a PN8 [ANOVA: F (1,4; 12,8) = 815; P < 0,001]. Durante este período não houve diferença de ganho de peso entre os animais injetados com etanol ou salina em nenhuma das idades (Tabela 4).

Tabela 4. Peso médio das ninhadas no Estudo 2.

	Peso médio das ninhadas (g)			
	PN2	PN4	PN6	PN8
SALINA	1,8 ± 0,9	2,5 ± 0,1	3,4 ± 0,2	4,3 ± 0,2
ETOH	2,1 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,5 ± 0,1	4,4 ± 0,1

Valores representam as médias ± EPM

No dia do teste, PN30, a média de peso dos machos (23,5 ± 0,4 gramas) foi significativamente maior que a média das fêmeas (21,7 ± 0,4 gramas), [uANOVA: F (1; 21) = 15,4; P < 0,05]. Contudo, não houve diferença de peso entre os animais que receberam injeções de etanol (23,2 ± 0,4 gramas) ou salina (21,9 ± 0,5 gramas) durante o período neonatal.

4.2.2 Medidas de ambulação

De modo geral, a ambulação na periferia ($105,2 \pm 4,2$ retângulos) foi maior que no centro ($22,5 \pm 4,2$ retângulos) [ANOVAu, $F(1; 138) = 191$; $P < 0,001$]. Quando os valores foram divididos pelo número de retângulos correspondentes a cada área da arena, essa diferença diminuiu, mas permaneceu significativamente diferente [ANOVAu, $F(1; 138) = 21,4$; $P < 0,001$].

Conforme indicado pelo efeito da EXPOSIÇÃO NEONATAL [$F(1; 62) = 10,8$; $P < 0,05$] e pela interação EXPOSIÇÃO NEONATAL \times INTERVALO [$F(4,8; 294,3) = 6,8$; $P < 0,001$], os animais expostos ao etanol apresentaram maior ambulação na periferia que os animais expostos à salina (figura 8A), sendo que esta diferença foi mais pronunciada na primeira metade do teste (figura 8B). O tratamento com Rolipram não foi capaz de reverter a hiperatividade induzida pelo etanol, contudo, os animais tratados com esta droga apresentaram uma redução da ambulação na periferia mais acentuada que os animais tratados com DMSO [TRATAMENTO EM P30 \times INTERVALO: $F(4,7; 294,3) = 2,6$; $P < 0,05$] (figuras 8). Vale mencionar que resultados semelhantes foram observados para as medidas de ambulação total [INTERVALO: $F(5,0; 311,9) = 5,9$, $P < 0,0001$; INTERVALO \times EXPOSIÇÃO NEONATAL: $F(5,0; 311,9) = 6,9$, $P < 0,0001$; e INTERVALO \times TRATAMENTO EM P30: $F(5,0; 311,9) = 3,1$; $P < 0,05$] (figura 9).

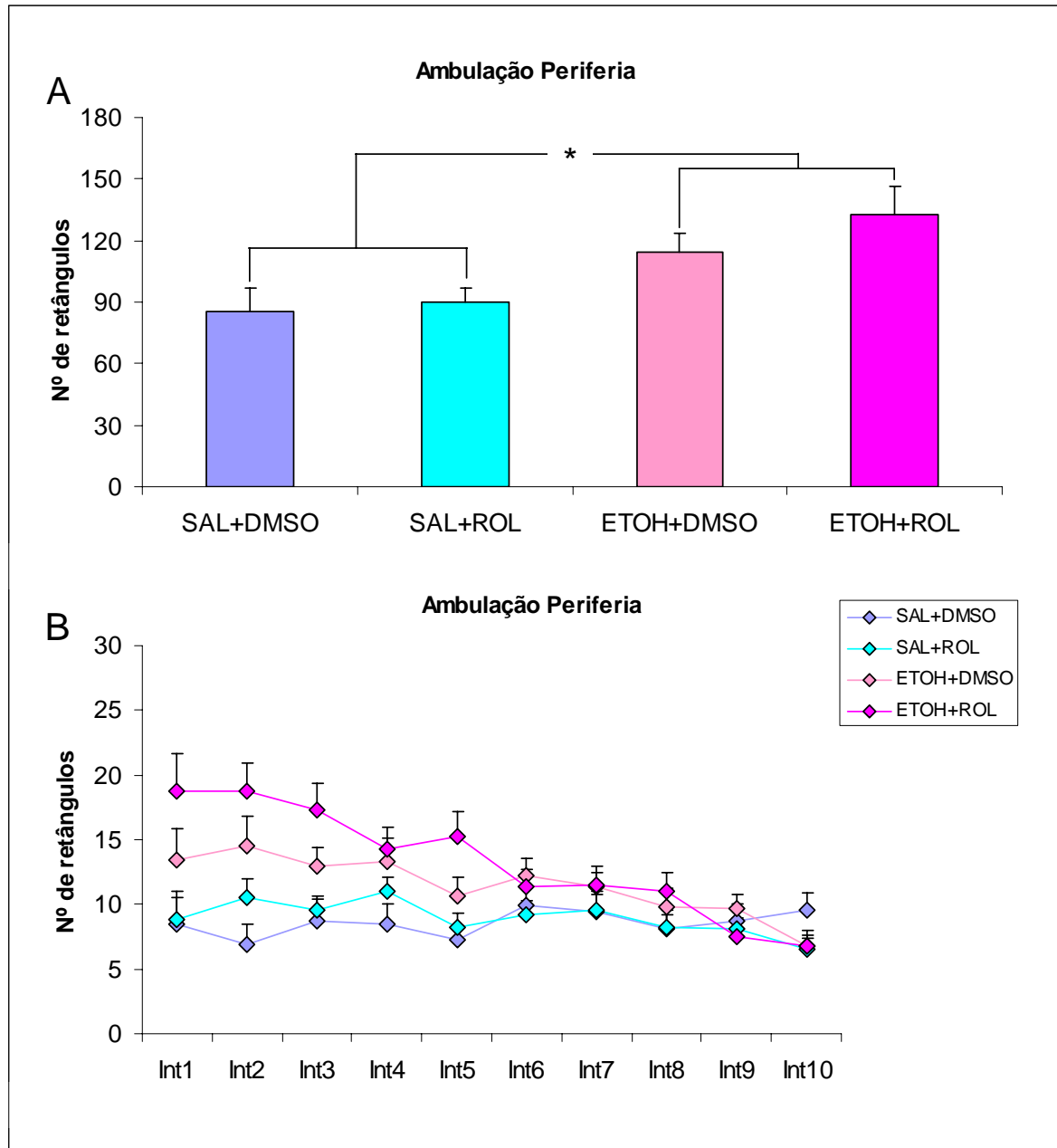


Figura 8. Médias (+EPM) da ambulação na periferia dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Rolipram (ROL) ou veículo (DMSO) no dia do teste de campo. Em A, estão representados os valores obtidos no tempo total de teste (10 minutos). Em B, estão representados os valores obtidos ao longo dos 10 intervalos de 1 minuto. Notar que os animais expostos ao etanol apresentaram maior atividade locomotora que os animais expostos à salina (A) e que esta diferença foi mais acentuada na primeira metade do teste (B). Teste FLSD: * $P < 0,05$.

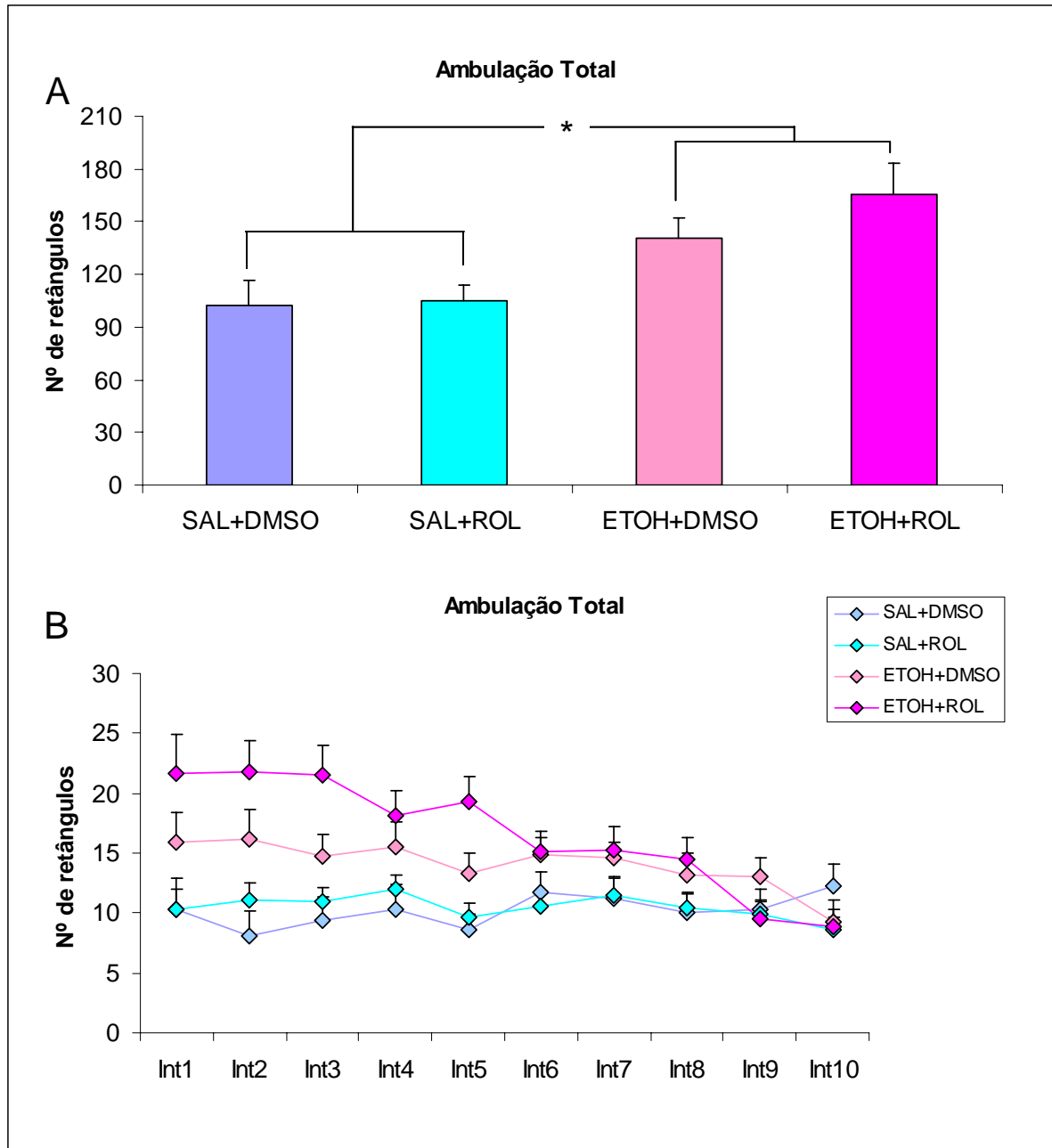


Figura 9. Médias (+EPM) da ambulação total dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Rolipram (ROL) ou veículo (DMSO) no dia do teste de campo. Em A, estão representados os valores obtidos no tempo total de teste (10 minutos). Em B, estão representados os valores obtidos ao longo dos 10 intervalos de 1 minuto. Notar que os animais expostos ao etanol apresentaram maior atividade locomotora que os animais expostos à salina (A) e que esta diferença foi mais acentuada na primeira metade do teste (B). Teste FLSD: * $P < 0,05$.

Conforme indicado pelo efeito da EXPOSIÇÃO NEONATAL [$F(1; 62) = 14,2; P < 0,001$] e da interação EXPOSIÇÃO NEONATAL \times INTERVALO [$F(6,3; 391,6) = 2,7; P < 0,05$], os animais expostos ao etanol apresentaram maior atividade no centro que os animais expostos à salina (figura 10A), sendo que, esta diferença foi mais pronunciada na primeira metade do teste (figura 10B). Contudo, o tratamento com Rolipram não foi capaz de reverter a hiperatividade induzida pelo etanol (figura 10B).

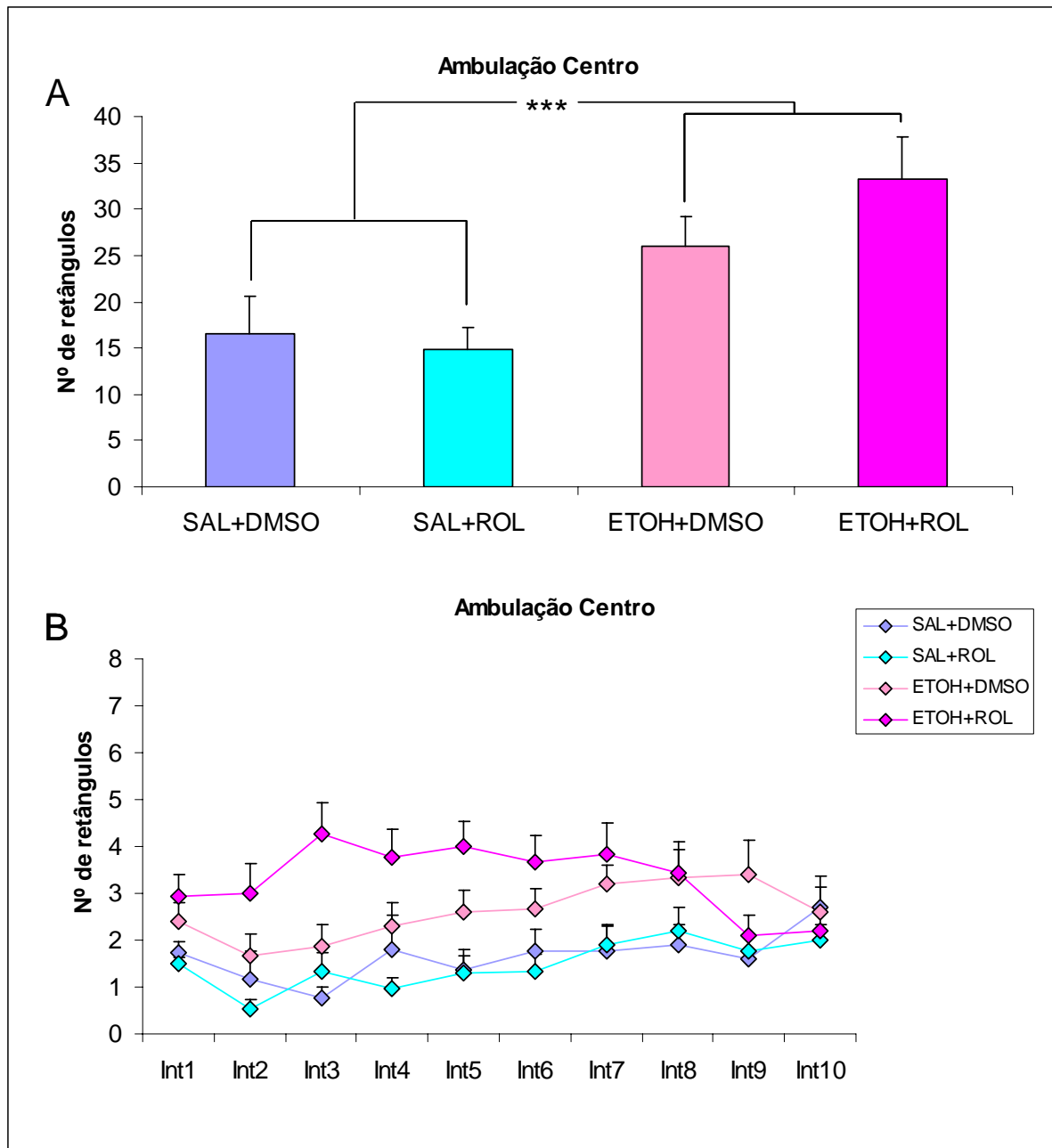


Figura 10. Médias (+EPM) da ambulação no centro do campo aberto dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou salina (SAL) no período neonatal e tratados com Rolipram (ROL) ou veículo (DMSO) no dia do teste de campo. Em A, estão representados os valores obtidos no tempo total de teste (10 minutos). Em B, estão representados os valores obtidos ao longo dos 10 intervalos de 1 minuto. Notar que os animais expostos ao etanol apresentaram maior atividade locomotora que os animais expostos à salina (A). Teste FLSD: *** $P < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

5.1 Resumo dos resultados

Apesar do caráter invasivo das injeções intraperitoneais, a maioria dos animais sobreviveu até o trigésimo dia pós-natal. Além disso, não foram observadas diferenças entre o ganho de peso dos animais injetados com salina e etanol. A exposição ao etanol no período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana gerou hiperatividade no período pré-puberal. Nos dois estudos realizados, os animais do grupo ETOH+DMSO apresentaram maior atividade locomotora do que do grupo SALINA+DMSO. O tratamento com a Vinpocetina reverteu a hiperatividade induzida pela exposição neonatal ao etanol de forma dose dependente, com efeito apenas da dose de 20mg/Kg. Em acordo com esta idéia, a atividade locomotora dos animais do grupo ETOH+VP20 foi menor que a do grupo ETOH+DMSO e não diferiu dos animais dos grupos SAL+DMSO e SAL+VP20. Na dose de 10mg/kg, o tratamento com a Vinpocetina não foi eficaz em reverter a hiperatividade, visto que os animais ETOH+VP10 não foram diferentes dos animais ETOH+DMSO.

No hipocampo, os animais do grupo ETOH+DMSO apresentaram níveis menores de AMPc quando comparados aos níveis dos animais do grupo SALINA+DMSO. Estes níveis foram restaurados pelo tratamento com a Vinpocetina na dose de 20mg/Kg (SAL+DMSO= ETOH+VP20 > ETOH+DMSO). No córtex, os níveis de AMPc dos animais expostos a salina (SALINA+DMSO e SALINA+VP20, amostra combinada) foram significativamente maiores que os níveis dos animais expostos ao etanol (ETOH+DMSO e ETOH+VP20 amostra combinada) e os níveis de AMPc dos animais ETOH+VP20 foram maiores que os níveis dos animais SAL+DMSO.

O tratamento com Rolipram não reverteu a hiperatividade gerada pela exposição neonatal ao etanol. Apesar da atividade locomotora do grupo ETOH+DMSO ter sido maior do que a dos animais do grupo SALINA+DMSO, Não foram observadas diferenças entre os grupos ETOH+ROL e ETOH+DMSO.

5.2 Injeção intraperitoneal, ganho de peso e mortalidade

Diversas técnicas de administração de etanol em roedores neonatos vêm sendo utilizadas tais como: a criação artificial (pup in the cup model), a administração por via oral (gavagem) e as câmaras de inalação de vapor de etanol (Diaz e Samson, 1980; Kelly e

Lawrence, 2008; Pal e Alkana, 1997). Apesar da reprodutibilidade dos dados obtidos com estas técnicas, cada uma delas apresenta desvantagens e limitações. Em todos os casos, outros fatores inerentes as técnicas, além da toxicidade do etanol, podem afetar os resultados neurocomportamentais. No modelo de criação artificial (Diaz e Samson, 1980), tubos são cirurgicamente implantados no estômago dos neonatos e os filhotes ficam isolados da mãe e do restante da ninhada. O animal não desenvolve o comportamento de mamar, além de sua temperatura corporal ser controlada artificialmente. Contudo, o aspecto mais negativo diz respeito a separação dos filhotes da mãe, a diminuição ou ausência dos cuidados maternos pode potencialmente afetar o desenvolvimento cerebral e comportamental dos indivíduos (Dominguez e Thomas, 2008). No modelo de gavagem (Kelly e Lawrence, 2008), uma cânula flexível é introduzida através da cavidade oral até o estômago apenas no momento da administração do etanol. Neste caso, os filhotes são submetidos a constante manipulação e separação materna. No modelo de inalação de vapor de etanol (Pal e Alkana, 1997; Moore *et al.*, 2004), o vapor de etanol pode irritar as trato respiratório e induzir intenso estresse na mãe e nos filhotes.

No presente estudo, os animais foram expostos ao etanol via injeções intraperitoneais. Esta via de administração foi utilizada em estudos prévios do nosso grupo (Filgueiras *et al.*, 2009; 2010) e, apesar do estresse causado pela manipulação dos animais durante o período de exposição e do caráter invasivo das injeções, a técnica tem como aspectos positivos a simplicidade, a rapidez com que o álcool atinge o sistema nervoso central e a possibilidade de corrigir a dose de álcool pelo peso dos animais. Nossos dados mostraram que não houve diferença entre as taxas de sobrevivência dos animais dos grupos SALINA e ETANOL e que a maioria dos animais sobreviveu às injeções, dado que está em acordo com os estudos anteriores realizados em camundongos (Filgueiras *et al.*, 2009) e em ratos (Filgueiras *et al.*, 2010) e que reforçam a segurança e exequibilidade desta via de administração.

O fato da via de administração do etanol utilizado neste estudo não afetar o ganho de peso dos animais durante o tratamento neonatal (PN2, PN4, PN6 PN8) ou em PN30 está em acordo com outros estudos (Filgueiras *et al.*, 2009; Karaçay *et al.*, 2008; O'Leary-Moore *et al.*, 2006; Pal e Alkana, 1997). Pal e Alkana (1997) demonstraram que camundongos expostos ao etanol em vapor (BEC variando de 160 a 290mg/dL) de PN2 a PN14 não tiveram diferenças de peso em relação aos seus controles durante o período de tratamento. Em PN21, ratos expostos ao etanol por via intra-gástrica de PN4 a PN9 (dose de ETOH = 5g/Kg, BEC = 320 ±7mg/dL) também não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos animais não expostos (O'Leary-Moore *et al.*, 2006). Em PN25, não houve diferenças

significativas no peso de camundongos C57BL/6 que receberam etanol i.p. (4.4g/Kg BEC em torno de 310mg/dL) com relação aos que receberam salina durante o período equivalente ao terceiro trimestre de gestação (Karaçay *et al.*, 2008). Vale mencionar que, em estudo anterior realizado por nosso grupo, utilizando o mesmo protocolo para injeção dos animais adotado neste estudo, não foram observadas diferenças entre animais injetados (grupos ETOH e SALINA) e não injetados com relação ao ganho de peso durante o tratamento ou em PN32 (Filgueiras *et al.*, 2009). Este dado é particularmente interessante, pois sugere que a administração de etanol não afeta os animais do ponto de vista nutricional.

5.3 Ambulação no centro e na periferia do campo aberto

De modo geral, a ambulação na periferia foi maior que a ambulação no centro do campo aberto para os dois grupos experimentais. Se considerarmos que os animais possuem igual probabilidade de estar sobre qualquer um dos retângulos, poderíamos supor que este resultado decorre do simples fato de que o número de retângulos, na periferia ($n = 12$) é maior que o do centro ($n = 4$). Contudo, quando corrigimos a ambulação pelo número de retângulos em cada região do campo aberto, a atividade na periferia se manteve significativamente maior que no centro. Este resultado está em acordo com outros trabalhos que demonstraram que roedores colocados no centro de um campo aberto tendem a se aproximar da parede e a se locomover ao longo da periferia do campo, evitando assim permanecer no centro da arena (Femke *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Huston e Bures, 1983; Simon *et al.*, 1994; Steiner *et al.*, 1988).

A aversão dos animais ao centro do campo aberto tem sido interpretada dentro de uma perspectiva evolucionista (Palanza, 2001; Choleris *et al.*, 2001). Em geral, assume-se que os animais foram filogeneticamente moldados por seleção natural para exibir respostas de medo ou ansiedade a situações de risco potencial, como por exemplo, espaços abertos (Palanza, 2001; Choleris *et al.*, 2001). Este comportamento tem servido de base a diversos modelos animais de ansiedade (Palanza, 2001; Choleris *et al.*, 2001). Vários trabalhos têm demonstrado que a administração de diversas drogas ansiolíticas ou tratamentos com ação ansiolítica aumentam o tempo de permanência no centro da arena (Kumar *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2010). Desta forma, a ausência de diferenças entre os animais dos grupos ETOH e SALINA com relação às medidas de ambulação no centro sugere que a exposição ao etanol no período equivalente ao terceiro trimestre não afeta a ansiedade dos animais em PN30. Vale mencionar que embora estudos apontem um aumento na ocorrência de distúrbios de ansiedade

em humanos (Barr *et al.*, 2006), resultados discrepantes em relação aos níveis de ansiedade têm sido observados em roedores. Fêmeas de ratos expostas ao etanol durante todo o período gestacional apresentaram, em PN40, um aumento nos níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE), um paradigma que, como o campo aberto, utiliza a aversão por espaços abertos como indicador de ansiedade (Vaglenova *et al.*, 2007). Em outro estudo utilizando o LCE, a exposição gestacional ao etanol promoveu um efeito ansiolítico, não dependente do sexo, em ratos de 21 dias de vida (Carneiro *et al.*, 2005).

5.4 Neurobiologia do Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade

Embora a neurobiologia do TDAH não seja completamente conhecida, um grande número de evidências aponta para um envolvimento importante do sistema dopaminérgico na manifestação dos principais sintomas deste transtorno (Pliszka, 1998; Zametkin e Rapoport, 1987, Cockburn e Holroyd, 2010). Estudos em humanos e animais têm demonstrado que o aumento de atividade locomotora, a diminuição da capacidade de sustentar a atenção e a impulsividade, todos característicos do TDAH, estão relacionados a uma hipofunção nos sistemas dopaminérgicos (Streissguth, 1997; Hagerman, 1999; Hannigan e Randall, 1996; O'Malley e Hagerman, 1998; Abel, 1984; Discroll *et al.*, 1990). Em acordo com esta idéia, os medicamentos estimulantes como o metilfenidato, frequentemente utilizado tratamento do TDAH, tem como mecanismo de ação a inibição do transportador de dopamina, bloqueando a recaptação de dopamina nos neurônios pré-sinápticos e aumentando desta forma a liberação de dopamina na fenda sináptica (Elia *et al.*, 1990). De modo interessante, polimorfismos em genes ligados à transmissão dopaminérgica, particularmente genes receptores de dopamina (DRD4, DRD5) e o gene para o transportador de dopamina (DAT1/SLC6A3) têm sido descritos como possíveis responsáveis pela alta predisposição genética de um indivíduo apresentar o TDAH (Banaschewski *et al.*, 2010). Vale mencionar ainda que um número crescente de trabalhos vêm sugerindo que a disfunção dopaminérgica observada no TDAH está associada a uma disfunção noradrenérgica (Vaidya e Stollstorff, 2008). De fato, as vias neurais associadas ao TDAH são ricas em catecolaminas (Biederman, 2005). Além disso, alterações conjuntas nas funções dopaminérgicas e noradrenérgicas parecem ser necessárias para eficácia clínica e farmacológica do tratamento do TDAH (Zametkin e Rapoport, 1987).

5.5 TDAH e sua e sua relação com a FASD

A despeito do fato que uma série de distúrbios neurocomportamentais são observados na FASD (Kelly *et al.*, 2000; Kodituwakku, 2009; May e Gossage 2001; Rasmussen, 2005), o TDAH é possivelmente o problema mais comumente observado em indivíduos expostos ao álcool durante o desenvolvimento (Bhatara *et al.*, 2006; Burd *et al.*, 2003; Doig *et al.*, 2008 e Rasmussen *et al.*, 2010). Estima-se que cerca de 41% das crianças com FASD também apresentam TDAH (Bhatara, *et al.*, 2006). Em particular, em crianças com Síndrome Alcoólica Fetal, que representa uma manifestação mais severa da exposição gestacional ao álcool (Goodlett *et al.*, 2005; Riley e McGee, 2005), este percentual varia de 73% (Burd *et al.*, 2003) a 95% (Fryer *et al.*, 2007). De modo interessante, a hiperatividade locomotora é uma característica comumente observada em diversas linhagens de roedores utilizados como modelos de estudo da FASD (Mill 2007; Russell, 2007) e em roedores expostos ao etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Kelly *et al.*, 1987; Melcer *et al.*, 1994; Riley *et al.*, 1993; Slawecki *et al.*, 2004 e Thomas *et al.*, 2001; 2007), que é um período crítico em que o sistema nervoso é particularmente sensível aos efeitos teratogênicos do etanol (Autti-Ramo *et al.*, 1992; Downing *et al.*, 2009; Korkman *et al.*, 1994; Olney, 2002). Apesar da alta associação entre TDAH e FASD, a característica etiológica que liga estas duas condições permanece desconhecida.

De modo geral, é bem aceito que a redução de funcionamento do sistema dopaminérgico mesolímbico está relacionado ao fenótipo da hiperatividade que pode estar presente na FASD e TDAH (Choong e Shen, 2004; O'Malley e Nanson, 2002). Contudo, enquanto a dopamina parece ser o principal neurotransmissor envolvido na fisiopatologia do TDAH (van der Kooij e Glennon, 2007), a exposição ao etanol durante o desenvolvimento afeta uma série de sistemas neurotransmissores como os sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, glutamatérgicos e gabaérgicos (Isayama *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2010). Este ponto é particularmente importante visto que pode afetar a eficácia das drogas psicoestimulantes como o metilfenidato e a d-anfetamina em populações de FASD (Doig *et al.*, 2008; Premji *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2010). Estudos têm demonstrado que a dopamina modula a neurotransmissão e afeta a plasticidade sináptica em circuitos de regiões cerebrais como o córtex pré-frontal e o hipocampo (Goto e Grace 2007; Gurden *et al.*, 1999; Gurden *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a potenciação de longa duração (LTP) das sinapses hipocampais e do córtex pré-frontal é mediada pelos níveis de atividade dopaminérgica mesocortical (Gurden *et al.*, 1999; Gurden *et al.*, 2000). Camundongos com depleção do fator

de transcrição SRF (*serum factor response*), que é um fator chave para a expressão de genes relacionados à plasticidade, em neurônios dopaminérgicos, apresentam um marcante aumento na atividade locomotora compatível com a hiperatividade (Parkitna *et al.*, 2010). Diversas evidências indicam que alterações na expressão de genes relacionados à plasticidade podem resultar em mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de psicopatologias envolvendo hiperatividade, como o TDAH (Banaschewski *et al.*, 2010; Engel *et al.*, 2009; Steffensen *et al.*, 1996; Tsai 2007).

De modo interessante, a exposição ao etanol durante o desenvolvimento pode promover alterações persistentes na plasticidade neuronal. Estas alterações podem afetar o funcionamento cerebral e estar relacionadas aos déficits neurológicos presentes na FASD (Medina e Krahe, 2008; Rema e Ebner, 1999; Zucca e Valenzuela, 2010). Em acordo com esta idéia, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a exposição neonatal ao etanol inibe o LTP no hipocampo de ratos (Puglia e Valenzuela, 2010; Zucca e Valenzuela, 2010). Medina e colaboradores demonstraram que furões expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação humana e que foram submetidos à privação mono-ocular após um longo período após do término da exposição apresentaram danos na plasticidade das colunas de dominância ocular (Medina *et al.*, 2003; Medina e Ramoa, 2005). Em ratos adultos o pareamento de vibrissas, paradigma usado para avaliar plasticidade do córtex somatossensorial, ocorre em menos de um dia nos controles e em animais expostos ao etanol durante a gestação foram necessários 14 dias (Rema e Ebner, 1999). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que déficits na plasticidade neuronal podem estar envolvidos na hiperatividade observada na FASD e TDAH. Nossos dados mostrando que o tratamento com Vinpocetina reverte a hiperatividade observada nos animais expostos ao etanol está em acordo com esta idéia.

5.6 Restauração dos níveis de AMPc no hipocampo pelo tratamento com Vinpocetina

O fato do tratamento com Vinpocetina ser capaz de restaurar os níveis de AMPc no hipocampo dos animais expostos ao etanol está em acordo com estudos que sugerem que a via de sinalização regulada pelo AMPc desempenha um papel importante nos mecanismos de plasticidade neural.

Na via de sinalização regulada pelo AMPc, a ativação da adenilato ciclase causada pela ligação da dopamina com os receptores D1 ou do glutamato com os receptores NMDA promove o aumento dos níveis de AMPc. O aumento dos níveis de AMPc leva a ativação de

proteínas quinases, tais como a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que fosforilam o fator de transcrição CREB. A ativação do CREB leva a transcrição de uma série de genes relacionados à plasticidade (Frank e Greenberg, 1994; Medina e Krahe, 2008). Vale mencionar que a exposição ao etanol durante o desenvolvimento é capaz de afetar vários elementos nesta via de sinalização. Particularmente, a exposição gestacional ao etanol reduz a densidade de receptores NMDA e diminui a capacidade de geração de LTPs no hipocampo de ratos com 45 dias de vida (Savage *et al.*, 1992). A exposição gestacional ao álcool também promove uma redução no número de receptores D1 no sistema dopaminérgico mesolímbico de ratos adultos (Druse *et al.*, 1990). Durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana, a exposição ao etanol provoca a redução dos níveis de CREB fosforilado no hipocampo de ratos adultos (Roberson *et al.*, 2009) e no córtex visual de furões adultos (Krahe *et al.*, 2009). De modo interessante, os distúrbios observados na linhagem de ratos SHR (*spontaneous hypertensive rats*), uma linhagem amplamente utilizada como modelo de TDAH, tem sido associados a defeitos na formação de AMPc (Russell, 2003). Além disso, a inibição da PKA no córtex pré-frontal de ratos produz déficits de atenção e hiperatividade locomotora que pode ser útil como modelo animal para o TDAH (Paine *et al.*, 2009).

5.7 Inibidores da fosfodiesterase e reversão da hiperatividade

Com base nas evidências descritas acima, é razoável supor que os efeitos benéficos descritos para o tratamento com Vinpocetina neste estudo estejam associados com a capacidade desta droga aumentar os níveis de AMPc. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que um aumento nos níveis de GMPc seria o principal fator ou contribuiria de modo predominante para o efeito da Vinpocetina na reversão da hiperatividade induzida pela exposição precoce ao etanol (Barnstable *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2010; Prickaerts *et al.*, 2002). Em acordo com esta idéia, apenas o tratamento com Vinpocetina reverteu a hiperatividade gerada pela exposição neonatal ao etanol, resultado que não foi observado com o tratamento com Rolipram. A Vinpocetina é um inibidor da PDE 1, enzima que atua na regulação dos níveis de AMPc e GMPc e o Rolipram é inibidor específico da PDE 4, enzima que atua predominantemente na regulação dos níveis de AMPc (Bender e Beavo, 2006).

O GMPc é produzido pela enzima guanilato ciclase que é estimulada pelo óxido nítrico (NO). As vias de sinalização do NO estão amplamente envolvidas em processos de plasticidade sináptica e formação de memória (Schuman e Madison, 1991; Bredt e Snyder, 1992; Zhuo *et al.*, 1994; Arancio *et al.*, 1996; Son *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999).

A formação de GMPc pode levar a ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG está envolvida em processos como a localização de alvos sinápticos e a mobilização de vesículas sinápticas em células pré-sinápticas, levando a um aumento da liberação de neurotransmissores (Hawkins *et al.*, 1993; 1998) e ativação de cascatas de sinalização de proteínas kinases em células pós-sinápticas, causando, por sua vez, a ativação de transcrição e tradução, processos críticos para a plasticidade sináptica e a formação de memória (Lu *et al.*, 1999; Chien *et al.*, 2003). A PKG pode ativar o CREB diretamente, através de fosforilação que ocorre no mesmo sítio de fosforilação da PKA (Lu *et al.*, 1999), ou indiretamente pela via de MAP kinases. Neste caso, a PKG ativa a MEK que fosforila a ERK que, por sua vez, fosforila o CREB (Ota *et al.*, 2008). As MAP kinases são proteínas importante para sinalização intracelular de tradução e desempenham um papel crítico na plasticidade neural e resposta inflamatória (Ji *et al.*, 2009).

Estudos vêm demonstrando que as vias AMPc/PKA e GMPc/PKG podem participar de processos relacionados a plasticidade em diferentes etapas. Os segundos mensageiros, AMPc e GMPc, participam de processos de memória em geral e em particular do processo de potenciação de longa duração (Bach *et al.*, 1999; Bernabeu *et al.*, 1996; Bourtchouladze *et al.*, 1998; Frey *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1999; Prickaerts *et al.*, 2002; Son *et al.*, 1998). Alguns autores demonstraram que, na região CA1 do hipocampo, processos tardios da potenciação de longa duração são reduzidos por inibidores da PKA ou estão reduzidos em indivíduos que apresentam distúrbios relacionados a esta proteína, enquanto processos relacionados a fases mais iniciais, de modo geral, não são dependentes da PKA (Frey *et al.*, 1993; Huang e Kandel, 1994; Huang *et al.*, 1996; Abel *et al.*, 1997; Nguyen e Kandel, 1997).

Vale mencionar ainda que a eficácia da Vinpocetina pode ser atribuída a ativação do fator de transcrição SRF. O aumento da expressão de SRF induzido pelo vetor viral Sindbis promove a recuperação da plasticidade das colunas de dominância ocular no cortex visual de furões adultos expostos ao etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Paul *et al.*, 2010). De modo interessante, foi demonstrado que a deleção do SRF em neurônios dopaminoceptivos provoca um aumento marcante da atividade locomotora de camundongos (Parkitna *et al.*, 2010). Considerando que muitos genes relacionados a plasticidade neural requerem a activação conjunta do SRF e do CREB (Knoll e Nordheim, 2009), é possível especular que a ação da Vinpocetina depende de uma ação sinérgica destes dois fatores de transcrição.

A despeito do fato de a ativação do CREB e do SRF serem associados com mecanismos moleculares envolvidos na alteração da eficiência sináptica de longo prazo, como

por exemplo o LTP (Knoll e Nordheim, 2009; Benito e Barco, 2010), os efeitos restaurativos da Vinpocetina foram demonstrados apenas após um curto período de tempo após o tratamento (Filgueiras *et al.*, 2010; Krahe *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2006). Desta forma, se os efeitos benéficos da Vinpocetina são persistentes, (i.e. se fazem presentes mesmo vários dias após o tratamento) ainda permanece por ser investigado. Além disso, estudos adicionais em modelos animais de FASD também são requeridos para verificar se a Vinpocetina ou mesmo o Risperidona tem capacidade de reverter os outros aspectos da TDAH como a inatenção e a impulsividade. Este ponto é particularmente importante se considerarmos que crianças com FASD exibem mais déficits comportamentais, dificuldades de sustentar a atenção e impulsividade/hiperatividade do que crianças com TDAH não expostas ao álcool (Kodituwakku *et al.*, 2006). Além disso, a medicação típica para tratamento parece ser menos eficaz para normalizar os sintomas de inatenção em crianças com FASD (Doig *et al.*, 2008). Um questão de grande importância é que a Vinpocetina já vem sendo utilizada (como Cavinton®) em alguns países da Europa para o tratamento de doenças relacionadas a acidentes vasculares cerebrais sem demonstrar efeitos colaterais significativos na faixa de dose entre 15-45 mg/kg (Kidd, 1999). Assim, a segurança e disponibilidade destas drogas faz destas drogas agentes promissores para futuros estudos clínicos.

6 CONCLUSÃO

- Apenas a administração de Vinpocetina reverteu a hiperatividade de camundongos expostos ao etanol no período correspondente ao terceiro trimestre de gestação humana. A administração de Rolipram não foi eficiente para este objetivo.
- A administração de Vinpocetina restaurou os níveis de AMPc no hipocampo, que foram previamente reduzidos pela exposição neonatal ao etanol, e aumentou estes níveis no córtex.

Conclusão Geral

O tratamento com Vinpocetina aparece como uma nova perspectiva para novas abordagens de pesquisa e tratamento de alterações comportamentais, mais especificamente a hiperatividade, decorrentes do consumo de etanol durante o período gestacional.

REFERÊNCIAS

- ABEL L Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol effects. New York: Plenum Press, 1984.
- ABEL T, NGUYEN PV, BARAD M, DEUEL TA, KANDEL ER, BOURTCHOULADZE R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 1997; 88: 615-26
- AGUAYO LG, PEOPLES RW, YEH HH, YEVENES GE. GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; 2: 869-885.
- ALKONDON M, PEREIRA EF, BARBOSA CT, ALBUQUERQUE EX. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1997; 283:1396-1411.
- ALKONDON M, PEREIRA EF, EISENBERG HM, ALBUQUERQUE EX. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *The Journal of neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*. 1999; 19: 2693-26705.
- ALKONDON M, PEREIRA EF, EISENBERG HM, ALBUQUERQUE EX. Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks *The Journal of neuroscience: The official journal of the society for neuroscience*, 2000; 20: 66-75.
- ARANCIO O, KIEBLER M, LEE CJ, LEV-RAM V, TSIEN RY, KANDEL ER, HAWKINS RD. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, 1996; 87: 1025-35.
- ASTLEY SJ, MAGNUSON SI, OMNEL LM, CLARREN SK. Fetal alcohol syndrome: changes in craniofacial form with age, cognition, and timing of ethanol exposure in the macaque. *Teratology*, 1999; 59: 163-172.
- ATKINS CM, SELCHER JC, PETRAITIS JJ, TRZASKOS JM, SWEATT JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, 1998; 1: 602-609.
- AUTTI-RAMO I, KORKMAN M, HILAKIVI-CLARKE L, LEHTONEN M, HALMESMAKI E, GRANSTROM ML. Mental development of 2-year-old children exposed to alcohol in utero. *J Pediatr.*, 1992; 120: 740-746.
- BACH ME, BARAD M, SON H, ZHUO M, LU YF, SHIH R, MANSUY I, HAWKINS RD, KANDEL ER. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999;96: 5280-5.
- BACSKAI BJ, HOCHNER B, MAHAUT-SMITH M, ADAMS SR, KAANG BK, KANDEL ER, TSIEN RY. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*, 1993; 260: 222-226.

BANAKAR MK, KUDLUR NS, GEORGE S. Fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *Indian Journal of Pediatrics*, 2009; 76: 1173-1175.

BANASCHEWSKI T, BECKER K, SCHERAG S, FRANKE B, COGHILL D. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2010; 19: 237-257.

BANNISTER AJ, KOUZARIDES T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 1996; 384: 641-643.

BARAD M, BOURTCHOULADZE R, WINDER DG, GOLAN H, KANDEL E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A.*, 1998; 95: 15020-15025.

BARNSTABLE CJ, WEI JY, HAN MH. Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem. Int.*, 2004; 45: 875-884.

BARR AM, HOFMANN CE, PHILLIPS AG, WEINBERG J, HONER WG. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2005; 29: 1915-20.

BAUER-MOFFETT C, ALTMAN J. The effect of ethanol chronically administered to preweanling rats on cerebellar development: a morphological study. *Brain Research*, 1977; 119: 249-268.

BEAVER CJ, JI Q, FISCHER QS, DAW NW. Cyclic AMP-dependent protein kinase mediates ocular dominance shifts in cat visual cortex. *Nature Neuroscience*, 2001; 4:159-163.

BEAVO JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews*, 1995; 75: 725-748.

BENDER AT, BEAVO JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews*, 2006; 58: 488-520.

BENITO E, BARCO A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci.*, 2010; 33: 230-240.

BERNABEU R, SCHMITZ P, FAILLACE MP, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport.*, 1996; 7: 585-8.

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

BIEDERMAN J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry*, 2005; 57: 1215-20.

BITO H, DEISSEROTH K, TSIEN RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 1996; 87: 1203-1214.

BLOKLAND A, SCHREIBER R, PRICKAERTS J. Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Current Pharmaceutical Design*, 2006; 12: 2511-2523.

BOBON D, BREULET M, GERARD-VANDENHOVE MA, GUIOT-GOFFIOUL F, PLOMTEUX G, SASTRE-Y-HERNÁNDEZ M, SCHRATZER M, TROISFONTAINES B, VON FRENCKELL R, WACHTEL H. Is phosphodiesterase inhibition a new mechanism of antidepressant action? A double blind double-dummy study between rolipram and desipramine in hospitalized major and/or endogenous depressives. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, 1988; 238: 2-6.

BOURTCHOULADZE R, ABEL T, BERMAN N, GORDON R, LAPIDUS K, KANDEL ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem.*, 1998; 5: 365-74.

BOURTCHOULADZE R, LIDGE R, CATAPANO R, STANLEY J, GOSSWEILER S, ROMASHKO D, SCOTT R, TULLY T. A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003; 100: 10518-10522.

BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992; 8: 3-11.

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

BURD L, KLUG MG, MARTSOLF JT, KERBESHIAN J. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicology and Teratology*, 2003; 25: 697-705.

BURDEN MJ, JACOBSON SW, SOKOL RJ, JACOBSON JL. Effects of prenatal alcohol exposure on attention and working memory at 7.5 years of age, *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2005; 29:443-452.

CALI JJ, ZWAAGSTRA JC, MONS N, COOPER DM, KRUPINSKI J. Type VIII adenylyl cyclase. A Ca²⁺/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain *The Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269: 12190-12195.

CARAVAGGI AM, SARDI A, BALDOLI GF, DE FRANCESCO CF, LUCA C. Hemodynamic profile of a new cerebral vasodilator, vincamine and of one of its derivatives, apovincaminic acid ethylester (RGH-4405). *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 1977; 226: 139-48.

CARBONI E, ACQUAS E, FRAU R, DI CHIARA G. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *European Journal of Pharmacology*, 1989; 164: 515-519.

CARNEIRO LM, DIOGENES JP, VASCONCELOS SM, ARAGAO GF, NORONHA EC, GOMES PB, VIANA GS. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2005; 27, 585-592.

CEBRID, 2002- DADOS REFERENTES AO USO DE ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DADOS%20REFERENTES.pdf>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC (2002b). Alcohol use among women of childbearing age-United States, 1991-1999. *MMWR* 51: 273-276.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. FETAL ALCOHOL SYNDROME - CDC (2002a). Alaska, Arizona, Colorado, and New York, 1995-1997. *MMWR* 51: 433-435.

CHANG YC, HUANG AM, KUO YM, WANG ST, CHANG YY, HUANG CC. Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation. *Annals of Neurology*, 2003; 54: 706-718.

CHANGEUX JP, DANCHIN A. Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature*, 1976; 264: 705-712.

CHAPPELL TD, MARGRET CP, LI CX, WATERS RS. Long-term effects of prenatal alcohol exposure on the size of the whisker representation in juvenile and adult rat barrel cortex. *Alcohol*, 2007; 41: 239-251.

CHEN WJ, MAIER SE, PARNELL SE, WEST JR. Alcohol and the developing brain: neuroanatomical studies *Alcohol Research & Health*, 2003; 27: 174-180.

CHEUNG WY. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Evidence for and properties of a protein activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 1970; 246:2859-2869.

CHIEN WL, LIANG KC, TENG CM, KUO SC, LEE FY, FU WM. Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. *Molecular Pharmacology*, 2003; 63:1322-1328.

CHIESA R, PICCARDO P, DOSSENA S, NOWOSLAWSKI L, ROTH KA, GHETTI B, HARRIS DA. Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A.*, 2005; 102: 238-243.

CHIODO LM, DA COSTA DE, HANNIGAN JH, COVINGTON CY, SOKOL RJ, JANISSE J, GREENWALD M, AGER J, DELANEY-BLACK V. The impact of maternal age on the effects of prenatal alcohol exposure on attention. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2010.

CHOI IY, ALLAN AM, CUNNINGHAM LA. Moderate fetal alcohol exposure impairs the neurogenic response to an enriched environment in adult mice. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2005; 29: 2053-2062.

CHOLERIS E, THOMAS, AW, KAVALIERS M, PRATO FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 2001; 25: 235-260.

CHOONG KC, SHEN RY. Methylphenidate restores ventral tegmental area dopamine neuron activity in prenatal ethanol-exposed rats by augmenting dopamine neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2004; 309: 444-451.

CLEMENTS KM, GIRARD TA, ELLARD CG, WAINWRIGHT PE. Short-term memory impairment and reduced hippocampal c-Fos expression in an animal model of fetal alcohol syndrome. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2005; 29: 1049 -1059.

COCKBURN J, HOLROYD C. Focus on the positive: Computational simulations implicate asymmetrical reward prediction error signals in childhood Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Brain Research*, 2010.

COLES CD, BROWN RT, SMITH IE, PLATZMAN KA, ERICKSON S, FALEK A. Effects of prenatal alcohol exposure at school age. I. Physical and cognitive development *Neurotoxicology and Teratology*, 1991; 13: 357-367.

COLQUHOUN LM, PATRICK JW. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 1997; 39: 191-220.

COOK RT, KEINER JA, YEN A. Ethanol causes accelerated G1 arrest in differentiating HL-60 cells. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1990; 14: 695-703.

CORTOT A, JOBIN G, DUCROT F, AYMES C, GIRAUDEAUX V, MODIGLIANI R. Gastric emptying and gastrointestinal absorption of alcohol ingested with a meal. *Digestive Diseases and Science*, 1986; 31: 343-348.

CRAIR MC, MALENKA RC. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*, 1995; 375: 325-328.

CRAIR MC. Neuronal activity during development: permissive or instructive? *Current Opinion in Neurobiology*, 1999; 9: 88-93.

CUDD TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Experimental Biology and Medicine*. (Maywood) 2005; 230: 389-393.

DE MELLO MC, VENTURA AL, PAES DE CARVALHO R, KLEIN WL, DE MELLO FG. Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A.*, 1982; 79: 5708-5712.

DEISSEROTH K, HEIST EK, TSIEN RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*, 1998; 392:198-202.

DELTOUR L, ANG HL, DUESTER G. Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *FASEB Journal*, 1996; 10:1050-1057.

DIAZ J, SAMSON HH. Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science*, 1980; 208: 751-3.

D'MELLO SR, GALLI C, CIOTTI T, CALISSANO P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Science of U S A*, 1993; 90: 10989-10993.

DOBBING J, SANDS J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 1979; 3: 79-83.

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.*, 2008; 18: 365-371.

DOMINGUEZ HD, THOMAS JD. Artificial rearing. *Methods in Molecular Biology*, 2008; 447: 85-100.

DOWNING C, BALDERRAMA-DURBIN C, HAYES J, JOHNSON TE, GILLIAM D. No effect of prenatal alcohol exposure on activity in three inbred strains of mice. *Alcohol*, 2009; 44: 25-33.

DRISCOLL CD, STREISSGUTH AP, RILEY EP. Prenatal alcohol exposure: comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicology and Teratology*, 1990; 12: 231-237.

DRUSE MJ, TAJUDDIN N, KUO A, CONNERTY M. Effects of in utero ethanol exposure on the developing dopaminergic system in rats. *J Neurosci. Res.*, 1990; 27:233-240.

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

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. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 998-1040.

ELIA J, BORCHERDING BG, POTTER WZ, MEFFORD IN, RAPOPORT JL, KEYSOR CS. Stimulant drug treatment of hyperactivity: biochemical correlates. *Clin Pharmacol Ther.*, 1990; 48: 57-66.

ELLIOTT BM, FARADAY MM, PHILLIPS JM, GRUNBERG NE. Adolescent and adult female rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 2005; 80: 567-575.

ELLIOTT BM, GRUNBERG NE. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, 2005; 165:187-196.

ENGEL JA, BLOMQUIST O, ERICSON M, SÖDERPALM B. In: PALOMO T, BENINGER RJ, ARCHER T (1999), editors. *Neurochemical and behavioural studies on ethanol and nicotine interactions. Interactive monoaminergic basis of brain disorders*, Madrid. Editorial Sintesis; p. 231-248.

ENGEL SR, CRESO TK, HAO Y, SHEN Y, MAENG S, NEKRASOVA T, LANDRETH GE, MANJI HK, CHEN G. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the control of behavioral excitement. *Mol Psychiatry*, 2009; 14: 448-461.

FARAONE SV, PERLIS RH, DOYLE AE, SMOLLER JW, GORALNICK JJ, HOLMGREN MA, SKLAR P. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 2005; 57: 1313-1323.

FEMKE TA, PIJLMAN FT, VAN REE JM. Physical but not emotional stress induces a delay in behavioural coping responses in rats. *Behav. Brain Res.*, 2002; 136: 365-373.

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. *Neuroscience Letters*, 2010; 473: 202-207.

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. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2009; 93: 148-154.

FINKBEINER S, TAVAZOIE SF, MALORATSKY A, JACOBS KM, HARRIS KM, GREENBERG ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 1997; 19: 1031-1047.

FLEISCHHACKER WW, HINTERHUBER H, BAUER H, PFLUG B, BERNER P, SIMHANDL C, WOLF R, GERLACH W, JAKLITSCH H, SASTRE-Y-HERNÁNDEZ M, ET AL. A multicenter double-blind study of three different doses of the new cAMP-phosphodiesterase inhibitor rolipram in patients with major depressive disorder. *Neuropsychobiology*, 1992; 26: 59-64.

FRANCIS SH, CORBIN JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 1999; 36: 275-328.

FRANK DA, GREENBERG ME. CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell*, 1994; 79: 5-8.

FRANKLIN JL, JOHNSON EM JR. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends in Neuroscience*, 1992; 15: 501-508.

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

GENZEN JR, MCGEHEE DS. Nicotinic modulation of GABAergic synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn. *Brain research*, 2005; 1031: 229-237.

GENZEN JR, MCGEHEE DS. Short and long-term enhancement of excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100:6807-6812.

GHOSH A, GREENBERG ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 1995; 268: 239-247.

GILMAN AG. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A.*, 1970; 67: 305-312.

GINTY DD, KORNHAUSER JM, THOMPSON MA, BADING H, MAYO KE, TAKAHASHI JS, GREENBERG ME. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*, 1993; 260: 238-241.

GONZALEZ GA, MONTMINY MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 1989; 59: 675-680.

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. *Neuroscience Research*, 2006; 56: 400-408.

GOODLETT CR, HORN KH, ZHOU FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Experimental Biology and Medicine*, 2005; 230: 394-406.

GOODLETT CR, HORN KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcoholism Research & Health*, 2001; 25: 175-184.

GOODLETT CR, MARCUSSEN BL, WEST JR. A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss. *Alcohol*, 1990; 7: 107-114.

GOODLETT CR, WEST JR (1992). Maternal substance abuse and the developing nervous system. In Zagon I and Slotkin T (eds). Academic Press, San Diego, CA, 45-75.

GOTO Y, GRACE AA. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int Rev Neurobiol.*, 2007; 78: 41-68.

GRAY R RAJAN AS, RADCLIFFE KA, YAKEHIRO M, DANI JA. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, 1996; 383: 713-716.

GUERRI C, MONTOLIU C, RENAU-PIQUERAS J. Involvement of free radical mechanism in the toxic effects of alcohol: implications for fetal alcohol syndrome. *Advances in experimental medicine and biology*, 1994; 366:291-305.

GUERRI C, PASCUAL M, RENAU-PIQUERAS J. Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology*, 2001; 22: 593-599.

GUERRI C, RUPERT G, RENAU-PIQUERAS J (2006). Glial targets of developmental exposure to ethanol. In Miller MW (ed.). *Brain development*. Oxford: Oxford University Press, 295-312.

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.*, 2000; 20: RC106.

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*, 1999; 94: 1019-1027.

HAGERMAN RJ. Neurodevelopmental disorders. Diagnosis and treatment. New York: Oxford University. Press; p.3-59, 1999.

HALL CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal Comp. Psychol.*, 1934;18: 385– 403.

HAMRE KM, WEST JR. The effects of the timing of ethanol exposure during the brain growth spurt on the number of cerebellar Purkinje and granule cell nuclear profiles. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1993; 17: 610-622.

HANNIGAN JH, ARMANT DR. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Seminars in Neonatology*, 2000; 5: 243-254.

HANNIGAN JH, BERMAN RF. Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicology and Teratology*, 2000; 22: 103-111.

HANNIGAN JH, O'LEARY-MOORE SK, BERMAN RF. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 2007; 31: 202-211.

HANNIGAN JH, RANDALL S. Behavioral pharmacology in animals exposed prenatally to alcohol. In: Abel EL, editor. *Fetal Alcohol Syndrome: from mechanism to prevention*. New York: CRC Press; P.191-213, 1996.

HANSON MG JR, SHEN S, WIEMELT AP, MCMORRIS FA, BARRES BA. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *The Journal of Neuroscience*, 1998; 18: 7361-7371.

HARRIS SR, MACKAY LL, OSBORN JA. Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1995; 19: 660-665.

HAWKINS RD, KANDEL ER, SIEGELBAUM SA. Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.*, 1993; 16: 625-65.

HAWKINS RD, SON H, ARANCIO O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res.*, 1998; 118: 155-72.

HEATH CJ, PICCIOTTO MR. Nicotine-induced plasticity during development: modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology*, 2009; 56: 254-262.

HEATON MB, PAIVA M, MADORSKY I, SILER-MARSIGLIO K, SHAW G. Effect of bax deletion on ethanol sensitivity in the neonatal rat cerebellum. *Journal of Neurobiology*, 2006; 66: 95-101.

HEBB DO (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. Wiley: New York.

HO YJ, EICHENDORFF J, SCHWARTING RK. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav. Brain Res.*, 2002; 136: 1-12.

HUANG YY, KANDEL ER. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem.*, 1994; 1: 74-82.

HUANG YY, NGUYEN PV, ABEL T, KANDEL ER. Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn Mem.*, 1996; 3:74-85.

HUSTON JP, BURES J. Innate and motivated behavior. In: Bures, J.; Buresova, O.; Huston, J.P. (Orgs.). *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. Amsterdam: Elsevier, p.77-133, 1983.

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

INOZEMTSEV AN, TSELKOVA NV, BERNUI LKH, ZHUZHNIKOV DP, TUSHMALOVA NA. The effect of piracetam on the behavior of *Nauphoeta cinerea* cockroaches in an open field. *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni I P Pavlova*, 1998; 48: 260-266.

ISAYAMA RN, LEITE PE, LIMA JP, UZIEL D, YAMASAKI EN. Impact of ethanol on the developing GABAergic system. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009; 292: 1922-1939.

JENSEN V, RINHOLM JE, JOHANSEN TJ, MEDIN T, STORM-MATHISEN J, SAGVOLDEN T, HVALBY O, BERGERSEN LH. N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience*, 2009; 158: 353-364.

JI RR, GEREAU RW, MALCANGIO M, STRICHARTZ GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.*, 2009; 60: 135-48.

JOSSELYN SA, SHI C, CARLEZON WA JR, NEVE RL, NESTLER EJ, DAVIS M. Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdale. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21: 2404-2412.

KAKKAR R, RAJU RV, SHARMA RK. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). *Cellular and Molecular Life Science*, 1999; 55: 1164-1186.

KANDEL ER, SCHWARTZ H, JESSELL TM (2000). *Principles of Neuroscience*. Elsevier: New York.

KARAÇAY B, LI S, BONTHIUS DJ. Maturation-dependent alcohol resistance in the developing mouse: cerebellar neuronal loss and gene expression during alcohol-vulnerable and -resistant periods. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2008; 32: 1439-50.

KEE BL, ARIAS J, MONTMINY MR. Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996; 271: 2373-2375.

KELLY SJ, DAY N, STREISSGUTH AP. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. *Neurotoxicol Teratol.*, 2000; 22: 143-149.

KELLY SJ, LAWRENCE CR. Intra-gastric intubation of alcohol during the perinatal period. *Methods in Molecular Biology*, 2008; 447: 101-10.

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.*, 1987; 96: 580-593.

KLINTSOVA AY, GOODLETT CR, GREENOUGH WT. Therapeutic motor training ameliorates cerebellar effects of postnatal binge alcohol. *Neurotoxicology and Teratology*, 2000; 22: 125-132.

KLUG MG, BURD L. Fetal alcohol syndrome prevention: annual and cumulative cost savings. *Neurotoxicology and Teratology*, 2003; 25: 763-765.

KNOLL B, NORDHEIM A. Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci.*, 2009; 32: 432-442.

KODITUWAKKU PW. Neurocognitive profile in children with fetal alcohol spectrum disorders. *Dev Disabil Res Rev.*, 2009; 15: 218-224.

KOOB GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1992; 13: 177-184.

KOOB GF, ROBERTS AJ, SCHULTEIS G, PARSONS LH, HEYSER CJ, HYYTIA P, MERLO-PICH E, WEISS F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22:3-9.

KORKMAN M, HILAKIVI-CLARKE LA, AUTTI-RAMO I, FELLMAN V, GRANSTROM ML. Cognitive impairments at two years of age after prenatal alcohol exposure or perinatal asphyxia. *Neuropediatrics*, 1994; 25: 101-105.

KOTCH LE, SULIK KK. Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis for a variety of associated facial and brain anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 1992; 44: 168-176.

KRAHE TE, WANG W, MEDINA AE. Phosphodiesterase inhibition increases CREB phosphorylation and restores orientation selectivity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *PLoS One*, 2009; 4: e6643.

KUMAR V, SINGH RK, JAISWAL AK, BHATTACHARYA SK, ACHARYA SB. Anxiolytic activity of Indian *Abies pindrow* Royle leaves in rodents: an experimental study. *Indian J. Exp. Biol.*, 2000; 38: 343-6.

LACROIX P, QUINIOU MJ, LINEE P, LE POLLES JB. Cerebral metabolic and hemodynamic activities of l-eburnamonine in the anesthetized dog. A comparison with vincamine. *Arzneimittelforschung*, 1979; 29: 1094-1101.

LAMPRECHT A, LEDOUX J. Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004; 5: 45-54.

LAMPRECHT R. CREB: a message to remember. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999; 55: 554-563.

- LARA J, KUSANO K, HOUSE S, GAINER H. Interactions of cyclic adenosine monophosphate, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor treatment on the survival and growth of postnatal mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Experimental Neurology*, 2003; 180: 32-345.
- LEMARQUAND D, PIHL RO, BENKELFAT C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biological Psychiatry*, 1994a; 36: 395-421.
- LEMARQUAND D, PIHL RO, BENKELFAT C. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: clinical evidence *Biological Psychiatry*, 1994b; 36: 326-337.
- LIMA JOSÉ MAURO BRAZ (2008). Álcool e gravidez, Síndrome Alcoólica Fetal SAF (tabaco e outras drogas). Medbook (ed). Introdução, 1-5.
- LINDSTROM J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Molecular neurobiology*, 1997; 15: 193-222.
- LOWRY OH, ROSEBEROUGH NJ, SARRAL RANDAL R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951; 193: 265–275.
- LU YF, KANDEL ER, HAWKINS RD. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus *The Journal of Neuroscience*, 1999 ;19: 10250-10261.
- MAAS JW, INDACOCHEA RA, MUGLIA LM, TRANT TT, VOGT SK, WEST T, BENZ A, SHUTE AA, HOLTZMAN DM, MENNERICK S, OLNEY JW, MUGLIA LJ. Calcium-stimulated adenylyl cyclases modulate ethanol-induced neurodegeneration in the neonatal brain. *The journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2005; 25: 2376-2385.
- MAIER SE, WEST JR. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. *Alcohol Research & Health*, 2001; 25: 168-174.
- MALENKA RC, NICOLL RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, 1999 17; 285:1870-1874.
- MATSUO N, TAKAO K, NAKANISHI K, YAMASAKI N, TANDA K, MIYAKAWA T. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2010; 4: 29.
- MATSUZAWA H, NIRENBERG M. Receptor-mediated shifts in cGMP and cAMP levels in neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A*, 1975; 72: 3472–3476.
- MATTSON SN, RILEY EP, GRAMLING L, DELIS DC, JONES KL. Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology*, 1998; 12: 146-153.
- MATTSON SN, RILEY EP. A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 279-294.

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

MEDINA AE, KRAHE TE, COPPOLA DM, RAMOA AS. Neonatal alcohol exposure induces long-lasting impairment of visual cortical plasticity in ferrets. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23: 10002-10012.

MEDINA AE, KRAHE TE, RAMOA AS. Early alcohol exposure induces persistent alteration of cortical columnar organization and reduced orientation selectivity in the visual cortex. *J Neurophysiol.*, 2005; 93: 1317-1325.

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

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

MEDINA AE, RAMOA AS. Early alcohol exposure impairs ocular dominance plasticity throughout the critical period. *Developmental Brain Research*, 2005; 157: 107-111.

MEDINA AE. Vinpocetine as a potent antiinflammatory agent. *Proceedings of the National Academy of Science of U S A*, 2010; 107: 9921-9922.

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

MENNERICK S, ZORUMSKI CF. Neural activity and survival in the developing nervous system *Molecular Neurobiology*, 2000; 22: 41-54.

MEYER-FRANKE A, KAPLAN MR, PFRIEGER FW, BARRES BA. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*, 1995; 15: 805-819.

MEYER-FRANKE A, WILKINSON GA, KRUTTGEN A, HU M, MUNRO E, HANSON MG JR, REICHARDT LF, BARRES BA. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron*, 1998; 21: 681-693.

MILL J. Rodent models: utility for candidate gene studies in human attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *J Neurosci Methods*, 2007; 166: 294-305.

MILLER MW (2006). Early exposure to ethanol affects the proliferation of neuronal precursors. In Miller MW (ed.). *Brain development. Normal Processes and Effects of Alcohol and Nicotine*. Oxford: Oxford University Press, 182-198.

MILLER MW. Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science*, 1986; 233: 1308-1311.

MILLER WM. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1996; 20: 139-143.

MIÑANA R, CLIMENT E, BARETTINO D, SEGUI JM, RENU-PIQUERAS J, GUERRI C. Alcohol exposure alters the expression pattern of neural cell adhesion molecules during brain development. *Journal of Neurochemistry*, 2000; 75:954-964.

MONTI B, BERTEOTTI C, CONTESTABILE A. Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 2006; 31: 278-286.

MOONEY SM, MILLER MW, HENDERSON GI (2006). Intracellular events in ethanol-induced neuronal death. In Miller MW (ed.). *Brain development. Normal Processes and Effects of Alcohol and Nicotine*. Oxford: Oxford University Press, 267-278.

MOORE DB, MADORSKY I, PAIVA M, BARROW HEATON M. Ethanol exposure alters neurotrophin receptor expression in the rat central nervous system: Effects of neonatal exposure. *Journal of Neurobiol.*, 2004; 60: 114-26.

MOORE DB, WALKER DW, HEATON MB. Neonatal ethanol exposure alters bcl-2 family mRNA levels in the rat cerebellar vermis. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1999; 23: 1251-1261.

MORI T, AISTRUP GL, NISHIKAWA K, MARSZALEC W, YEH JZ, NARAHASHI T. Basis of variable sensitivities of GABA(A) receptors to ethanol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2000; 24: 965-971.

MORIGUCHI S, ZHAO X, MARSZALEC W, YEH JZ, NARAHASHI T. Effects of ethanol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2007; 31: 89-99.

MOWER AF, LIAO DS, NESTLER EJ, NEVE RL, RAMOA AS. cAMP/Ca²⁺ response element-binding protein function is essential for ocular dominance plasticity. *Journal of Neuroscience*, 2002; 22: 2237-245.

MURAD F, MITTAL CK, ARNOLD WP, KATSUKI S, KIMURA H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Advances Cyclic Nucleotide Research*, 1978; 9: 145-158.

MURPHY JM, MCBRIDE WJ, LUMENG L, LI TK. Contents of monoamines in forebrain regions of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) lines of rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1987; 26: 389-392.

NAGAKURA A, NIIMURA M, TAKEO S. Effects of a phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on microsphere embolism-induced defects in memory function and cerebral cyclic AMP signal transduction system in rats. *British Journal of Pharmacology*, 2002; 135: 1783-193.

NGUYEN PV, KANDEL ER. Brief theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in area CA1 of the mouse hippocampus. *Learn Mem.*, 1997; 4: 230-43.

NICHOLSON CD. Pharmacology of nootropics and metabolically active compounds in relation to their use in dementia. *Psychopharmacology*, 1990; 101:147-59.

NOWOSLAWSKI L, KLOCKE BJ, ROTH KA. Molecular regulation of acute ethanol-induced neuron apoptosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2005; 64: 490-497.

O'MALLEY KD, HAGERMAN RJ. Developing clinical practice guidelines for pharmacological interventions with alcohol-affected children. In: Center for Disease Control and Prevention, editors. *Intervening with children affected by prenatal alcohol exposure: proceedings of a special focus session of the interagency coordinating committee on Fetal Alcohol Syndrome*. Chevy Chase (MD): National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; p.145-177.

OGRYZKO VV, SCHILTZ RL, RUSSANOVA V, HOWARD BH, NAKATANI Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 1996; 87: 953-959.

OHTA K, SAKATA-HAGA H, FUKUI Y. Alteration in anxiety-related behaviors and reduction of serotonergic neurons in raphe nuclei in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Congenital Anomalies (Kyoto)*, 2010; 50: 105-114.

O'LEARY-MOORE SK, MCMECHAN AP, MATHISON SN, BERMAN RF, HANNIGAN JH. Reversal learning after prenatal or early postnatal alcohol exposure in juvenile and adult rats. *Alcohol*, 2006; 38: 99-110.

OLNEY JW, WOZNIAK DF, JEVTOVIC-TODOROVIC V, FARBER NB, BITTIGU P, IKONOMIDOU C. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathology*, 2002; 12: 488-498.

OLNEY JW. Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addiction Biology*, 2004; 9: 137-149.

OLNEY JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*, 2002; 23: 659-668.

O'MALLEY KD, NANSON J. Clinical implications of a link between fetal alcohol spectrum disorder and attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry*, 2002; 47: 349-354.

OTA KT, PIERRE VJ, PLOSKI JE, QUEEN K, SCHAFE GE. The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learning & Memory*, 2008; 15: 792-805.

PAINE TA, NEVE RL, CARLEZON WA, JR. Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34: 2143-2155.

PAL N, ALKANA RL. Use of inhalation to study the effect of ethanol and ethanol dependence on neonatal mouse development without maternal separation: a preliminary study. *Life Science*, 1997; 61: 1269-81.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci and Biobehav Revs.*, 2001; 25: 219-233.

PARKITNA JR, BILBAO A, RIEKER C, ENGBLOM D, PIECHOTA M, NORDHEIM A, SPANAGEL R, SCHÜTZ G. Loss of the serum response factor in the dopamine system leads to hyperactivity. *The FASEB Journal*, 2010; 24: 2427-2435.

PASCUAL M, VALLES SL, RENAUI-PIQUERAS J. Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 2003; 87:1535-1545.

PAUL A, POHL-GUIMARAES F, KRAHE TE, FILGUEIRAS CC, LANTZ CL, COLELLO RJ, WANG W, MEDINA AE. Overexpression of serum response factor restores ocular dominance plasticity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *J Neurosci.*, 2010; 30: 2513-2520.

PHAM TA, IMPEY S, STORM DR, STRYKER MP. CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron*, 1999; 22: 63-72.

PHILBERT MA, BILLINGSLEY ML, REUHL KR. Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicology Pathology*, 2000; 28: 43-53.

PLISZKA SR. Comorbidity of attention-deficit/hyperactivity disorder with psychiatric disorder: an overview. *J Clin Psychiatry*, 1998; 59: 50-8.

PREMJI S, BENZIES K, SERRETT K, HAYDEN KA. Research-based interventions for children and youth with a Fetal Alcohol Spectrum Disorder: revealing the gap. *Child Care Health Dev.*, 2007; 33: 389-397.

PRICKAERTS J, DE VENTE J, HONIG W, STEINBUSCH HW, BLOKLAND A. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol.*, 2002; 436: 83-7.

PRICKAERTS J, DE VJ, HONIG W, STEINBUSCH HW, BLOKLAND A. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur.J.Pharmacol.* 436, 83-87, 2002.

PUGLIA MP, VALENZUELA C. Repeated third trimester-equivalent ethanol exposure inhibits long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of neonatal rats. *Alcohol*, 2010; 44: 283-290.

RAPOPORT JL, GOGTAY N. Brain neuroplasticity in healthy, hyperactive and psychotic children: insights from neuroimaging. *Neuropsychopharmacology*, 2008; 33: 181-197.

RASMUSSEN C, BENZ J, PEI J, ANDREW G, SCHULLER G, BELE-WEBSTER L, ALTON C, LORD L (2010) The impact of an ADHD co-morbidity on the diagnosis of FASD. *Can J Clin Pharmacol.*, 2010; 17: e165-e176.

RASMUSSEN C. Executive functioning and working memory in fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol Clin Exp Res.*, 2005; 29: 1359-1367.

RASMUSSEN C. Executive functioning and working memory in fetal alcohol spectrum disorder. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 2005; 29: 1359-1367.

- REIRIZ J, HOLM PC, ALBERCH J, ARENAS E. BMP-2 and cAMP elevation confer locus coeruleus neurons responsiveness to multiple neurotrophic factors *Journal of Neurobiology*, 2002; 50: 291-304.
- REMA V, EBNER FF. Effect of enriched environment rearing on impairments in cortical excitability and plasticity after prenatal alcohol exposure. *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19: 10993-11006.
- RENEERKENS OA, RUTTEN K, STEINBUSCH HW, BLOKLAND A, PRICKAERTS J. Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology (Berlin)*, 2009; 202: 419-443.
- RIFAS L, TOWLER DA, AVIOLI LV. Gestational exposure to ethanol suppresses msx2 expression in developing mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1997; 94:7549-7554.
- 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.*, 1993; 17: 1240-1246.
- RILEY EP, MCGEE CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Experimental Biology and Medicine*, 2005; 230: 357-365.
- ROBERSON R, CAMERONI I, TOSO L, ABEBE D, BISSEL S, SPONG CY. Alterations in phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element of binding protein activity: a pathway for fetal alcohol syndrome-related neurotoxicity. *American Journal Obstet Gynecol.*, 2009; 200: 193.e1-5.
- ROEBUCK TM, SIMMONS RW, MATTSON SN, RILEY EP. Prenatal exposure to alcohol affects the ability to maintain postural balance. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1998; 22: 252-258.
- ROLE LW AND BERG DK, Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, 1996; 16: 1077-1085.
- ROSDY B, BALÁZS M, SZPORNÝ L. Biochemical effects of ethyl apovincamate. *Arzneimittelforschung*, 1976; 26: 1923-1926.
- RUSSELL VA. Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurosci Methods*, 2007; 161: 185-198.
- RYABININ AE, COLE M, BLOOM FE, WILSON MC. Exposure of neonatal rats to alcohol by vapor inhalation demonstrates specificity of microcephaly and Purkinje cell loss but not astrogliosis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1995; 19: 784-791.
- SAKATA-HAGA H, SAWADA K, HISANO S, FUKUI Y. Administration schedule for an ethanol-containing diet in pregnancy affects types of offspring brain malformations. *Acta Neuropathologica*, 2002; 104: 305-312.
- SANSAR W, AHBOUCHA S, GAMRANI H. Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. *Acta Histochemica*, 2010; 23.

SAPP DW, YEH HH. Ethanol-GABAA receptor interactions: a comparison between cell lines and cerebellar Purkinje cells. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1998; 284: 768-776.

SARI Y, HAMMAD LA, SALEH MM, REBEC GV, MECHREF Y. Alteration of selective neurotransmitters in fetal brains of prenatally alcohol-treated C57BL/6 mice: quantitative analysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Int J Dev Neurosci.*, 2010; 28: 263-269.

SAVAGE DD, QUEEN SA, SANCHEZ CF, PAXTON LL, MAHONEY JC, GOODLETT CR, WEST JR. Prenatal ethanol exposure during the last third of gestation in rat reduces hippocampal NMDA agonist binding site density in 45-day-old offspring. *Alcohol*, 1992; 9: 37-41.

SCHAEFER ML, WONG ST, WOZNAK DF, MUGLIA LM, LIAUW JA, ZHUO M, NARDI A, HARTMAN RE, VOGT SK, LUEDKE CE, STORM DR, MUGLIA LJ. Altered stress-induced anxiety in adenylyl cyclase type VIII-deficient mice. *The Journal of Neuroscience*, 2000; 20: 4809-4820.

SCHAFE GE, ATKINS CM, SWANK MW, BAUER EP, SWEATT JD, LEDOUX JE. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 2000; 20: 8177-8187.

SCHUMAN EM, MADISON DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 1991;254: 1503-6.

SCOTT AI, PERINI AF, SHERING PA, WHALLEY LJ. In-patient major depression: is rolipram as effective as amitriptyline? *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1991; 40: 127-129.

SHIBOTA M, KAKIHANA M, NAGAOKA A. The effect of vinpocetine on brain glucose uptake in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1982; 80: 221-224.

SIEGENTHALER JA, MILLER MW (2006). Mechanisms of ethanol-induced alterations in neuronal migration. In Miller MW (ed.). *Brain development. Normal Processes and Effects of Alcohol and Nicotine*. Oxford: Oxford University Press, 216-229.

SIMON P, DUPUIS R, COSTENTIN J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice: Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Res.*, 1994; 61: 59-64.

SLAWECKI CJ, THOMAS JD, RILEY EP, EHLERS CL. Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat. *Alcohol*, 2004; 34: 187-196.

SON H, LU YF, ZHUO M, ARANCIO O, KANDEL ER, HAWKINS RD. The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learning & Memory*, 1998; 5:231-245.

SPOHR HL, WILLMS J, STEINHAUSEN HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *The journal of Pediatrics*, 2007; 150:175-179.

STEFFENSEN SC, WILSON MC, HENRIKSEN SJ. Coloboma contiguous gene deletion encompassing Snap alters hippocampal plasticity. *Synapse*, 1996; 22: 281-289.

STEINER H, BONATZ AE, HUSTON JP, SCHWARTING R. Lateralized wall-facing versus turning as measures of behavioral asymmetries and recovery of function after injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra. *Exp. Neurol.*, 1988; 99: 556–566.

STRATTON K, HOWE C, BATTAGLIA F. *Fetal Alcohol Syndrome: Diagnosis, Epidemiology, Prevention and Treatment*. National Academy Press, Washington DC, 1996.

STREISSGUTH AP, BARR HM, OLSON HC, SAMPSON PD, BOOKSTEIN FL, BURGESS DM. Drinking during pregnancy decreases word attack and arithmetic scores on standardized tests: adolescent data from a population-based prospective study. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1994; 18: 248-254.

STREISSGUTH AP, BARR HM, SAMPSON PD. Moderate prenatal alcohol exposure: effects on child IQ and learning problems at age 7 1/2 years *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 1990; 14: 662-669.

STREISSGUTH AP. *Fetal Alcohol Syndrome: a guide for families and communities*. Baltimore: Brooks Publishing Co. 1997.

SULIK KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 2005; 230: 366-375.

TABAKOFF B, VON WARTBURG JP. Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: metabolism of succinic semialdehyde and ethanol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1975; 63: 957-966.

TANG WJ, KRUPINSKI J, GILMAN AG. Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylylcyclase *The Journal of Biological Chemistry*, 1991; 266: 8595-8603.

TANG X, ORCHARD SM, SANFORD LD. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. *Behavioural Brain Research*, 2002; 136: 555-569.

TEIXEIRA MM, ROSSI AG, WILLIAMS TJ, HELLEWELL PG. Effects of phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on cutaneous inflammation in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*, 1994; 112: 332-340.

THOMAS JD, BIANE JS, O'BRYAN KA, O'NEILL TM, DOMINGUEZ HD. Choline supplementation following third-trimester-equivalent alcohol exposure attenuates behavioral alterations in rats. *Behav Neurosci.*, 2007; 121: 120-130.

THOMAS JD, FLEMING 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.*, 2001; 25: 764-773.

THOMAS JD, GARCIA GG, DOMINGUEZ HD. Administration of eliprodil during ethanol withdrawal in the neonatal rat attenuates ethanol-induced learning deficits. *Psychopharmacology*, 2004; 175:189-195.

THOMAS JD, GOODLETT CR, WEST JR. Alcohol-induced Purkinje cell loss depends on developmental timing of alcohol exposure and correlates with motor performance. *Brain Research Developmental Brain Research*, 1998; 105: 159-166.

TSAI SJ. Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: clinical and therapeutic implications. *Med Hypotheses*, 2007; 68: 896-899.

UECKER A, NADEL L. Spatial locations gone awry: object and spatial memory deficits in children with fetal alcohol syndrome. *Neuropsychologia*, 1996; 34: 209-223.

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

VAIDYA CJ, STOLLSTORFF M. Cognitive neuroscience of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: current status and working hypotheses. *Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2008; 14: 261-267.

VAN DER KOOIJ MA, GLENNON JC. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2007; 31: 597-618.

VELOSO D, PASSONNEAU JV, VEECH RL. The effects of intoxicating doses of ethanol upon intermediary metabolism in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 1972; 19: 2679-2686.

VERHAGE M, MAIA AS, PLOMP JJ, BRUSSAARD AB, HEEROMA JH, VERMEER H, TOONEN RF, HAMMER RE, VAN DEN BERG TK, MISSLER M, GEUZE HJ, SÜDHOF TC. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion *Science*, 2000; 287:864-869.

WACHTEL H. Characteristic behavioural alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Psychopharmacology (Berlin)*, 1982; 77: 309-316.

WAFFORD KA, BURNETT DM, DUNWIDDIE TV, HARRIS RA. Genetic differences in the ethanol sensitivity of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science (New York, NY)*, 1990; 249: 291-293.

WAFFORD KA, BURNETT DM, LEIDENHEIMER NJ, BURT DR, WANG JB, KOFUJI P, DUNWIDDIE TV, HARRIS RA, SIKELA JM Ethanol sensitivity of the GABAA receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. *Neuron*, 1991; 7: 27-33.

WAFFORD KA, WHITING PJ. Ethanol potentiation of GABAA receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the gamma 2 subunit. *FEBS letters*, 1992; 313: 113-117.

WAINWRIGHT PE. Issues of design and analysis relating to the use of multiparous species in developmental nutritional studies. *The Journal of Nutrition*, 1998; 128: 661-663.

WELCH-CARRE E. The neurodevelopmental consequences of prenatal alcohol exposure. *Advances in Neonatal Care: official journal of the national Association of Neonatal Nurses*, 2005; 5: 217-229.

WEST JR, HAMRE KM, CASSELL MD. Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 1986; 10: 190-197.

WEST JR, HODGES CA, BLACK AC JR. Prenatal exposure to ethanol alters the organization of hippocampal mossy fibers in rats *Science*, 1981; 211: 957-959.

WEST JR, PIERCE DR (1986). Perinatal alcohol exposure and neuronal damage. In: WEST JR, Ed. *Alcohol and Brain Development*. New York: Oxford University Press.

WILKEMEYER MF, MENKARI CE, CHARNESS ME. Novel antagonists of alcohol inhibition of 11-mediated cell adhesion: multiple mechanisms of action. *Molecular Pharmacology*, 2002; 62:1053-1060.

WONG ST, ATHOS J, FIGUEROA XA, PINEDA VV, SCHAEFER ML, CHAVKIN CC, MUGLIA LJ, STORM DR. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*, 1999; 23: 787-798.

WONNACOTT S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in neurosciences*, 1997; 20: 92-98.

WOO NH, LU B. Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders *Neuroscientist*, 2006; 12: 43-56.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Substance Abuse home. Management of Substance Abuse. 2004. Disponível em:
http://www.who.int/substance_abuse/facts/alcohol/en/index.html

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. The World Health Report. Quantifying selected major risks to health. 2002. Disponível em:
<http://www.who.int/whr/2002/en/index.html>.

WU ZL, THOMAS SA, VILLACRES EC, XIA Z, SIMMONS ML, CHAVKIN C, PALMITER RD, STORM DR. Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice *Proceedings of the National Academy of Science of U S A.*, 1995; 92: 220-224.

YANG X, CRISWELL HE, SIMSON P, MOY S, BREESE GR. Evidence for a selective effect of ethanol on N-methyl-d-aspartate responses: ethanol affects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-methyl-d-aspartate receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1996; 278: 114-124.

YOUNG C, KLOCKE BJ, TENKOVA T, CHOI J, LABRUYERE J, QIN YQ, HOLTZMAN DM, ROTH KA, OLNEY JW. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differentiation*, 2003; 10: 1148-55.

YOUNG C, ROTH KA, KLOCKE BJ. Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 2005; 20:608-614.

ZAMETKIN AJ, RAPOPORT JL. Noradrenergic hypothesis of attention deficit disorder with hyperactivity: A critical review. In: Meltzer HY, editor. *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven press 837-842, 1987.

ZHANG HT, CRISSMAN AM, DORAIRAJ NR, CHANDLER LJ, O'DONNELL JM. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE4) reverses memory deficits associated with NMDA receptor antagonism. *Neuropsychopharmacology*, 2000; 23:198-204.

ZHANG ZW. Canadian Association of Neurosciences review: postnatal development of the mammalian neocortex: role of activity revisited. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 2006; 33:158-169.

ZHUO M, HU Y, SCHULTZ C, KANDEL ER, HAWKINS RD. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*, 1994; 368: 635-9.

ZIMATKIN SM, DEITRICH RA. Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*, 1997; 2: 387-399.

ZUBKOV EA, KULIKOV AV. Effect of thyroxin on behavior of mice with inherited difference in predisposition to catalepsy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009; 147:217-219.

ZUCCA S, VALENZUELA C. Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca²⁺ channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.*, 2010; 30: 6776-6781.

ANEXO A - Manuscrito submetido para publicação**Restoration of neuronal plasticity by vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of Fetal Alcohol Spectrum Disorder.**

Fernanda Nunes, Kélvia Ferreira-Rosa, Maurício dos S. Pereira, Regina C. Kubrusly, Alex C. Manhães, Yael Abreu-Villaça, and Cláudio C. Filgueiras.

Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Professor Manuel de Abreu 444, 5 andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, 20550-170, Brazil. (F.N., K.F.R., A.C.M., Y.A.V., C.C.F.).

Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil. (R.C.K.,M.S.P.).

Running title: Restoration of plasticity ameliorates hyperactivity in FASD

Corresponding author: Cláudio C. Filgueiras

Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Professor Manuel de Abreu 444, 5 andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ, 20550-170, Brazil.

Phone: (5521) 2587-6295, FAX: (5521) 2587-6129

E-mail: ccfilg@pq.cnpq.br

19 text pages

1 tables

2 figures

46 references

193 words in the Abstract

642 words in the Introduction

1134 words in the Discussion

List of nonstandard abbreviations:

ADHD: attention-deficit/hyperactivity disorder

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

CREB: cAMP response element binding protein

FAS: fetal alcohol syndrome

FASD: fetal alcohol spectrum disorder

LTP: long-term potentiation

PKA: cAMP-dependent protein kinase A

SRF: serum response factor

Recommended section: Behavioral Pharmacology

Abstract

Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) is characterized by a range of neurobehavioral abnormalities and there is evidence that reduced neuronal plasticity could underlie some of these deficits. Since locomotor hyperactivity is one of the most characteristic outcomes of developmental alcohol intoxication and it has been associated with disturbances of neuroplasticity, here, we investigated whether administration of vinpocetine, a neuronal plasticity enhancer that acts by inhibiting the type 1 phosphodiesterase, ameliorates hyperactivity in mice exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. From postnatal day (P) 2 to P8, Swiss mice either received ethanol (5g/Kg i.p.) or saline every other day. At P30, the animals either received vinpocetine (20mg/Kg or 10mg/kg i.p.) or vehicle 4 hours before being tested in the open field. After the test, frontal cerebral cortices and hippocampuses were dissected and collected for assessment of cAMP levels. Early alcohol exposure significantly increased locomotor activity in the open field and reduced cAMP levels in the hippocampus. The treatment of ethanol-exposed animals with vinpocetine f 20mg/kg restored both their locomotor activity and cAMP levels to control levels. These data provide evidence for the potential therapeutic use of vinpocetine in FASD.

Introduction

Maternal alcohol use during pregnancy causes a continuum of long-lasting disabilities in the offspring (Riley and McGee, 2005), commonly referred to as fetal alcohol spectrum disorder (FASD). It was estimated that the prevalence of FASD in school children may be as high as 2-5% in developed countries (May, et al., 2009). Regarding the nervous system, ethanol interacts with or functionally alters many target molecules and disrupts several key processes during development (Goodlett, et al., 2005). The plurality of the ethanol insult makes the identification of sites of action mediating specific deficits quite complex and constrains the development of therapeutic approaches.

Several neurobehavioral problems can be observed in FASD (Riley and McGee, 2005). However, attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is possibly the most commonly observed behavioral problem (Bhatara, et al., 2006;Burd, et al., 2003;Doig, et al., 2008). It was estimated that as many as 41% of children with FASD have a comorbid ADHD diagnosis (Bhatara, et al., 2006) while in studies considering children with fetal alcohol syndrome (FAS), which represents the most severe outcome of prenatal alcohol exposure (Goodlett, et al., 2005;Riley and McGee, 2005), this percentage ranges from 73% (Burd, et al., 2003) to 95% (Fryer, et al., 2007). Interestingly, locomotor hyperactivity is a common trait observed in several inbred strains, knockouts, and transgenic rodents used as models of ADHD (Russell, 2007) as well in rodents exposed to ethanol during the third trimester equivalent period of human gestation (Melcer, et al., 1994;Slawecki, et al., 2004) , a period of development within which the brain is particularly sensitive to the teratogenic actions of ethanol (Downing, et al., 2009;Korkman, et al., 1994). Despite the strong association between ADHD and FASD, the exact etiological link between these conditions remains elusive. In addition, the efficacy of conventional pharmacological treatments for ADHD, such as the use of psychostimulant medications, in children exposed to alcohol during gestation is under debate (Doig, et al., 2008;Premji, et al., 2007).

Several lines of evidence suggest that deficits in neuronal plasticity (the lifelong ability of the brain to reorganize neural pathways in response to experience or environmental stimuli) may underlie the neurobehavioral problems observed in FASD (Filgueiras, et al., 2010;Krahe, et al., 2009;Medina and Krahe, 2008;Paul, et al., 2010;Zucca and Valenzuela, 2010). Therefore, the use of pharmacological or molecular tools to improve the cellular machinery responsible

for neuronal plasticity opens up a great possibility for the treatment of this condition. Vinpocetine, a derivative of the Vinca minor alkaloid vincamine, is a phosphodiesterase type I (PDE1) inhibitor that has been tested as a neuronal plasticity enhancer (Medina, 2010). The inhibition of PDE1 leads to an increase in cAMP and cGMP levels, which in turn, activates a series of kinases that phosphorylate the transcription factors CREB (cAMP response element binding protein) and SRF (serum response factor), leading to the expression of plasticity-related genes (Krahe, et al., 2009; Medina and Krahe, 2008; Paul, et al., 2010). Vinpocetine treatment has been shown to facilitate long-term potentiation (LTP) (Molnar, et al., 1994), to enhance the structural dynamics of dendritic spines (Lendvai, et al., 2003), to improve learning/memory in rats (DeNoble, 1987), and to enhance performance on cognitive tests in humans (Kidd, 1999). Recently, we showed that treatment with vinpocetine several days after the period of alcohol insult improves learning and memory deficits (Filgueiras, et al., 2010) and restores ocular dominance plasticity (Medina, et al., 2006) and orientation selectivity maps in the visual cortex (Krahe, et al., 2009) in animal models of FASD.

Considering that both the reduction in the expression of transcription factors and the deletion of genes related to plasticity are associated with a marked behavioral hyperactivity in mice (Parkitna, et al., 2010; Steffensen, et al., 1996; Tsai, 2007), in this work, we tested whether a pharmacologically induced increase in neuronal plasticity, using the PDE1 inhibitor vinpocetine, can ameliorate hyperactivity in mice exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation.

Methods

Animal treatment

This study was conducted under the State University of Rio de Janeiro institutional approval (protocol #: CEUA/040/2010). All experiments were carried out in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institutes of Health. The subjects were Swiss mice that were bred and maintained in our laboratory on a 12:12h light/dark cycle (lights on: 2:00, lights off: 14:00) at a constant temperature (22°C). Access to food and water was unrestricted. Original breeding stock was obtained from Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

In mouse and rat models of FASD, it is well accepted that the first 10-day period after birth corresponds to the third trimester of gestation in humans and encompasses the “brain growth spurt”, within which there is a surge in brain growth characterized by neurogenesis, dendritic arborization, synaptogenesis, myelination and the migration of multiple neuronal populations (Dobbing and Sands, 1979). Several lines of research have indicated that, during this period, the brain is particularly sensitive to ethanol (Downing, et al., 2009;Korkman, et al., 1994). Accordingly, from P2 to P8 (P1 = birth day), 104 animals from 9 litters received ethanol (5g/Kg i.p., 25% in saline solution) and 103 animals from 9 litters received an equivalent volume of saline solution every other day. The dose of ethanol was chosen based on previous studies (Filgueiras, et al., 2009), which show that it generates blood ethanol concentrations (BECs) within the range that a human fetus would be exposed to after maternal ingestion of a moderate to heavy dose of ethanol (Eckardt, et al., 1998). Treatment on alternate days was chosen since it mimics ‘binge’ drinking in humans, which is associated with severe cognitive and behavioral deficits. In order to minimize the risk of injury to internal organs, a 28-gauge needle was carefully inserted to just penetrate the abdominal wall and reach the peritoneal cavity. Leakage from the injection site was minimized by slowly withdrawing the needle from the abdominal cavity.

At weaning (P21), animals from the same litter were separated by sex and housed in groups of 2-5 mice by cage. From the initial sample of mice treated with ethanol or saline, only 149 were used in the present study. The other 58 animals, which were used in other studies, were considered only to estimate the mortality rate after ethanol or saline treatment. At P30, the animals were randomly assigned within each litter to receive treatment with vinpocetine 20 mg/kg (i.p., 99.9% in dimethylsulfoxide, DMSO), vinpocetine 10 mg/kg (i.p., or an equivalent volume of vehicle solution. Accordingly we had 6 treatment groups: SALINE+DMSO (14 females and 19 males), SALINE+VP10 (8 females and 8 males), SALINE+VP20 (10 females and 10 males), ETOH+DMSO (11 females and 13 males), ETOH+VP10 (13 females and 14 males), ETOH+VP20 (14 females and 15 males). Vinpocetine and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Injections were carried out 4 hours before the behavioral test. This time-interval was chosen because it is close to the peak of increase in cAMP levels induced by vinpocetine administration in mice (unpublished data). In addition, in a previous study we demonstrated that vinpocetine treatment 4 hours before Morris water maze testing improved learning and memory deficits in rats early exposed to alcohol (Filgueiras et al., 2010).

Open field test

The open field arena consisted of a polypropylene box ($37.6 \times 30.4 \times 17$ cm) in which the floor was divided into 16 same-sized rectangles (7.6×9.4 cm), 12 peripheral and 4 central. The experiments were conducted during the dark part of the daily cycle, 1-2 hr after its onset. Each mouse was individually placed in the center of the arena. Behaviors in the open field were recorded for 10 min with an overhead video camera. At the end of the session, the floor and walls were washed with odorless liquid soap, rinsed thoroughly with tap water, and dried with a disposable paper towel. The location of the apparatus did not vary from session to session.

Recorded images of the tests were used to analyze behavior in open field. The observer was blind regarding the experimental treatments of the animals. The ambulation was quantified on the basis of the number of rectangles crossed by the animals. Mice had to place all four legs on a given rectangle for a crossing to be counted. The following ambulation variables were evaluated: ambulation in the center (C), ambulation in the periphery (Pe), C/Pe ratio and total ambulation (C+Pe). In addition, considering that direct comparisons between the activity in the center and in periphery can be influenced by the fact that the number of rectangles in the periphery is greater than that in the center, the number of rectangles crossed in the center and in the periphery were respectively divided by 4 (C/4) and 12 (Pe/12). Furthermore, the 10-minute test was divided into 1 min time-intervals and behavioral analyses were also carried out for each of these intervals.

Blood ethanol concentration (BEC)

A separate group of mice was injected with ethanol or saline as described above. One or 2 hours after the second injection (at P4), animals were decapitated and the blood was collected mice exposed to ethanol (1hr: n = 13; 2hr: n = 9) and to saline (1hr: n = 10; 2hr: n = 6). Blood was centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the supernatant stored at 4 °C until assayed. BEC was assessed using an enzymatic kit (Alcohol Reagent Set, Pointe Scientific Inc., Michigan, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations.

cAMP levels

After the test, 60 animals (at least 7 per group) were sacrificed by cervical dislocation. Frontal cerebral cortices (approximately the rostral third of the cerebral wall) and hippocampuses were immediately dissected, collected and incubated for 1 hour at 37°C in minimum essential medium (MEM) buffered with 20mM HEPES at pH 7.3 and containing 100 mM ascorbic acid, 100 mM pargyline and 0.5mM Rolipram (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). After incubation, the reaction was interrupted by the addition of TCA to 10% (final concentration). cAMP was purified and assayed as described elsewhere (Gilman, 1970). cAMP levels were normalized to protein levels, assayed by the Lowry method.

Statistical analyses

Data are compiled as means and standard errors. In order to minimize the influence of litter effects, for all analyses, we considered the average of values from male and female mice of the same litter instead of using individual values. Separate univariate analyses of variance (uANOVA) were performed for weight data at P30, for cAMP levels in each region (frontal cerebral cortex or hippocampus) and for comparisons involving ambulation in the center and in the periphery of the open field. Repeated measures analyses of variance (rANOVA) were performed for both body weight data (postnatal; day as the within-subjects factor) and open field data (time-interval as the within-subjects factor). Neonatal exposure (ETOH or SALINE), treatment at P30 (VP10, VP20 or DMSO) and gender were used as between-subject factors for both uANOVAs and rANOVAs. Age and time interval were considered the within-subjects factor in rANOVAs. Regarding rANOVAs, for simplicity, we reported results based only on the averaged univariate F tests. Whenever the sphericity assumption was violated, we used the Greenhouse-Geisser correction, which adjusts the degrees of freedom, in order to avoid Type I errors. Significance was assumed at the level of $P < 0.05$ (two-tailed). In all cases, individual group differences were evaluated post-hoc by Fisher's Protected Least Significant Difference (FPLSD).

Results

Blood ethanol concentration, survival rate and body weight gain

Blood ethanol levels one and two hours after injection (5g/Kg i.p.) were 316.2 ± 9.6 and 321.4 ± 6.5 mg/dL, respectively. The majority of the animals survived saline and ethanol i.p. injections. Survival rates were 87.5% (n = 91) in the ethanol-injected group and 95.1% (n = 98) in the saline-injected group. The difference between groups did not reach statistical significance (Fisher's Exact Test, $P = 0.56$).

Offspring weights during the injection period are shown in table 1. The mean litter weights increased significantly from P2 to P8 [rANOVA, $F(1.2,18.7)=600.6$; $P<0.001$]. From P2 to P8, no differences were observed between ethanol-injected and saline-injected groups regarding weight gain or absolute weight at any age. At P30 (open field testing day) no differences in body weight were observed between ethanol (21.9 ± 0.6 g) or saline (21.6 ± 0.6 g) injected animals [uANOVA, $F(1,35) = 0.1$; $P=0.75$]. The mean litter weights of males (22.7 ± 0.6 g) was significantly higher than that of females (20.8 ± 0.6 g) [uANOVA, $F(1,35) = 4.6$; $P<0.05$], however, there was no interaction between gender and neonatal treatment [uANOVA, $F(1,35) = 0.01$; $P = 0.94$].

TABLE 1 HERE

Open field data

The ambulation in the periphery (89.5 ± 3.7) was significantly greater than in the center (19.0 ± 1.3) [uANOVA, $F(1,148) = 768.2$; $P < 0.001$]. When ambulation values were corrected for the corresponding number of rectangles in the periphery (7.5 ± 0.3) and in the center (4.8 ± 0.3), this difference, although still significant, was reduced in magnitude [uANOVA, $F(1,148) = 730.1$; $P < 0.001$].

The absence of a time-interval effect [rANOVA, $F(6.1, 387.4) = 1.0$; $P = 0.42$] indicates that the ambulation in the periphery did not change along the 10 min of the testing session. Importantly, the treatment with vinpocetine significantly ameliorated the hyperactivity induced by early alcohol exposure in a dose-dependent way. As indicated by the significant interaction between neonatal exposure and treatment at P30 [rANOVA, $F(2,63) = 3.3$; $P < 0.05$], the ETOH+DMSO group presented a higher ambulation than the SALINE+DMSO and ETOH+VP20 groups, which, in turn, did not differ from each other (Fig. 1). In spite of the absence of a difference between the SALINE+DMSO and ETOH+VP10 groups, the

ambulation of the ETOH+VP10 group did not differ significantly from that of the ETOH+DMSO group (Fig. 1). No significant differences were observed between males and females. Similar results were observed concerning total ambulation (C+Pe) [rANOVA: neonatal treatment \times treatment at P30 interaction, $F(2,62) = 3.6$; $P < 0.05$].

FIGURE 1 HERE

For both ambulation in the center and C/Pe ratio data increases in values were observed along the 10 time-intervals [rANOVA: ambulation in the center, $F(6.3, 393.1) = 3.3$; $P < 0.01$, and C/Pe ratio, $F(3.6, 120.1) = 2.7$; $P < 0.05$]. However, for these two variables, no differences were observed between groups. Furthermore, no effects or interactions regarding gender, neonatal exposure and treatment at P30 were observed.

Considering that the vinpocetine treatment effectively ameliorated hyperactivity only at the 20mg/kg dose, we decided to restrict the analysis of cAMP levels to this dose.

cAMP data

As expected, treatment with vinpocetine increased the levels of cAMP both in the hippocampus [uANOVA: $F(1,21) = 69.8$; $P < 0.001$] and in the cortex [uANOVA: $F(1,21) = 43.8$; $P < 0.001$]. In the hippocampus, neonatal exposure to ethanol significantly reduced the levels of cAMP [uANOVA, $F(1,21) = 63.9$; $P < 0.001$] and treatment with vinpocetine significantly restored cAMP levels. As indicated by the significant interaction between neonatal exposure and treatment at P30 [uANOVA, $F(1,21) = 9.1$; $P < 0.01$], cAMP levels in the ETOH+DMSO group were significantly lower than those observed in both SALINE+DMSO and ETOH+VP20 groups, which, in turn, did not differ from each other (Fig. 2A). No significant differences were observed between males and females.

In the cortex, there was a significant effect of neonatal exposure [uANOVA, $F(1,21) = 7.0$; $P < 0.05$] indicating that the levels of cAMP of the saline-exposed animals (SALINE+DMSO and SALINE+VP20 combined sample) were significantly higher than that of the ethanol-exposed ones (ETOH+DMSO and ETOH+VP20 combined sample). However, no differences were observed between the ETOH+DMSO and SALINE+DMSO groups when they were analyzed separately (Fig. 2B). Additionally, cAMP levels of the ETOH+VP20 group were

higher than those of the SALINE+DMSO group (Fig. 2B). No significant differences were observed between males and females.

FIGURE 2 HERE

Discussion

In the present study, we have shown that ethanol exposure during the third trimester equivalent of human gestation significantly increases locomotor activity in the open field and reduced cAMP levels in the hippocampus. We have also shown that the inhibition of the phosphodiesterase type 1 by vinpocetine significantly ameliorates hyperactivity and restores cAMP levels to control levels. Importantly, vinpocetine treatment was carried out considerably after the period of alcohol exposure, in a period equivalent to infancy/adolescence in humans. Our findings may be relevant from a clinical standpoint since it opens up the possibility for treating juveniles when prevention fails.

In general, it is well accepted that a reduction in the function of the mesolimbic dopaminergic system underlies the hyperactivity phenotype that can be detected both in FASD and ADHD (O'Malley and Nanson, 2002). However, while dopamine appears to be the prime neurotransmitter involved in the physiopathology of ADHD (van der Kooij and Glennon, 2007), the noradrenergic, serotonergic, cholinergic, glutamatergic and GABAergic systems also appear to be affected by early ethanol exposure (Sari, et al., 2010). This aspect is particularly important since it could affect the effectiveness of psychostimulant drugs, such as methylphenidate and d-amphetamine, in a FASD population. Interestingly, some studies have shown that dopamine modulates neurotransmission and, moreover, that it affects synaptic plasticity induced within the circuits of its target brain regions, such as the prefrontal cortex and the hippocampus (Goto and Grace, 2007). Several lines of research have been providing evidence that altered expression of plasticity genes could trigger molecular mechanisms responsible for the development of psychopathological conditions involving hyperactivity, such as ADHD (Banaschewski, et al., 2010; Parkitna, et al., 2010). In particular, there is growing evidence that ethanol intoxication during development produces a lingering disruption of neuronal plasticity, which can ultimately affect the brain function and underlie some of the neurological deficits seen in FASD (Medina and Krahe, 2008; Rema and Ebner, 1999; Zucca and Valenzuela, 2010). For instance, electrophysiological studies have shown that

neonatal alcohol exposure inhibits LTP, a mechanism involved with learning and memory processes, in the rat hippocampus (Zucca and Valenzuela, 2010). Ferrets exposed to ethanol during the third trimester equivalent of human gestation and monocularly deprived after a prolonged alcohol-free period presented a permanent impairment of ocular dominance plasticity (Medina and Krahe, 2008). In adult rats, the whisker pairing, a paradigm used to evaluate cortical barrel field plasticity induced by trimming all but two whiskers, occurred in less than one day in controls, but required 14 days in animals exposed to alcohol throughout gestation (Rema and Ebner, 1999). Taken together, these data suggests that neuronal plasticity deficits underlie the hyperactivity observed in FASD and ADHD. Our data showing that the treatment with vinpocetine, a plasticity enhancer, ameliorates the hyperactivity in mice exposed to ethanol during the neonatal period is in accordance with this idea.

Interestingly, the fact that vinpocetine restores hippocampal cAMP levels in ethanol-exposed mice suggests that an alteration in the cAMP-regulated signaling pathway could play a key role in generating the hyperactivity observed in FASD. In cAMP-regulated signaling pathways, the activation of adenylyl cyclase by the activation of D1 or NMDA receptors leads to the generation of intracellular cAMP that, in turn, activates protein kinases, such as cAMP-dependent protein kinase A (PKA). These kinases phosphorylate the transcription factor CREB, thereby activating it and leading to the transcription of plasticity-related genes (Frank and Greenberg, 1994; Medina and Krahe, 2008). Of note, ethanol exposure during development can alter several key factors in this cascade. Gestational ethanol exposure reduces the density of the NMDA receptor agonist binding sites and decreases the capacity to elicit LTP in hippocampal formation of 45-day-old rat offspring (Savage, et al., 1992). A lingering reduction of D1 receptors of the mesolimbic dopamine system is also observed in rats exposed to ethanol during gestation (Druse, et al., 1990). Neonatal alcohol exposure promotes a reduction in CREB phosphorylation in the adult mice hippocampus (Roberson, et al., 2009) and in the visual cortex of ferrets (Krahe, et al., 2009). Interestingly, the disturbances in spontaneously hypertensive rats (SHR), a strain used as an ADHD model, has been associated with impaired cAMP formation (Russell, 2003). The PKA inhibition within the medial prefrontal cortex of rats produces inattention and hyperactivity, and thus might be useful in modeling human attention disorders (Paine, et al., 2009).

Based on the evidence described above, it is reasonable to suppose that the beneficial effects of vinpocetine are associated with the ability of this drug to increase cAMP levels, thereby

improving neuronal plasticity. However, we cannot discard the possibility that increased cGMP levels are actually either the major player or that it significantly contributes to the vinpocetine-mediated amelioration of hyperactivity in alcohol-treated animals (Paul, et al., 2010). Furthermore, the efficacy of vinpocetine can also be attributed to the activation of the SRF transcriptional factor. Accordingly, the overexpression of SRF by a Sindbis viral vector, long after the period of alcohol exposure, leads to a widespread plasticity enhancement that can rescue ocular dominance plasticity in the visual cortex of a ferret model of FASD (Paul, et al., 2010). Of note, it has been demonstrated that mice with deletion of SRF in dopaminergic neurons present a marked locomotor hyperactivity (Parkitna, et al., 2010). Considering that many genes necessary for plasticity-related events require activation of both CREB and SRF (Knoll and Nordheim, 2009), it is conceivable that the restorative action of vinpocetine depends on a synergistic action of these two transcriptional factors.

In spite of the fact that the activation of both CREB and SRF have been associated with molecular mechanism involved in long-lasting changes in synaptic efficiency (Knoll and Nordheim, 2009; Benito and Barco, 2010), the restorative effects of the vinpocetine have been demonstrated only for short periods after treatment (Filgueiras, et al., 2010; Krahe, et al., 2009; Medina, et al., 2006). Therefore, whether the amelioration of the neurobehavioral deficits induced by ethanol during development is persistent remain to be investigated. Further studies in animal models of FASD are also required in order to verify if the treatment with vinpocetine has beneficial effects on the other two core features of ADHD: inattention and impulsivity. This issue is particularly important since it was found that although children with FASD display more behavioral problems and difficulties with attention and hyperactivity/impulsivity than typical children, attention deficits tend to account for more problems than hyperactive symptoms (Kodituwakku, et al., 2006). Additionally, the ADHD medication may be less effective in treating the inattention symptom cluster in the FASD population (Doig, et al., 2008). Another question that should be considered is that vinpocetine is already used (as Cavinton ©) in some countries to treat cerebrovascular-related diseases without showing significant side effects at dose ranging from 15 to 45 mg per day (Kidd, 1999). Therefore, the safety and availability of this drug make this compound a promising agent for future clinical studies.

Reference List

- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B and Coghill D (2010) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:237-257.
- Benito E and Barco A (2010) CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci* 33:230-240.
- Bhatara V, Loudenberg R and Ellis R (2006) Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J Atten Disord* 9:515-522.
- Burd L, Klug MG, Martsolf JT and Kerbeshian J (2003) Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicol Teratol* 25:697-705.
- DeNoble VJ (1987) Vinpocetine enhances retrieval of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 26:183-186.
- Dobbing J and Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3:79-83.
- Doig J, McLennan JD and Gibbard WB (2008) Medication effects on symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in children with fetal alcohol spectrum disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 18:365-371.
- Downing C, Balderrama-Durbin C, Hayes J, Johnson TE and Gilliam D (2009) No effect of prenatal alcohol exposure on activity in three inbred strains of mice. *Alcohol Alcohol* 44:25-33.
- Druse MJ, Tajuddin N, Kuo A and Connerty M (1990) Effects of in utero ethanol exposure on the developing dopaminergic system in rats. *J Neurosci Res* 27:233-240.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK and Tabakoff B (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 22:998-1040.
- Filgueiras CC, Krahe TE and Medina AE (2010) Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. *Neurosci Lett* 473:202-207.
- Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, Abreu-Villaça Y and Manhães AC (2009) Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 93:148-154.
- Frank DA and Greenberg ME (1994) CREB: a mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79:5-8.

- Fryer SL, McGee CL, Matt GE, Riley EP and Mattson SN (2007) Evaluation of psychopathological conditions in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Pediatrics* 119:e733-e741.
- Gilman AG (1970) A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:305-312.
- Goodlett CR, Horn KH and Zhou FC (2005) Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:394-406.
- Goto Y and Grace AA (2007) The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int Rev Neurobiol* 78:41-68.
- Kidd PM (1999) A review of nutrients and botanicals in the integrative management of cognitive dysfunction. *Altern Med Rev* 4:144-161.
- Knoll B and Nordheim A (2009) Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci* 32:432-442.
- Kodituwakku P, Coriale G, Fiorentino D, Aragon AS, Kalberg WO, Buckley D, Gossage JP, Ceccanti M and May PA (2006) Neurobehavioral characteristics of children with fetal alcohol spectrum disorders in communities from Italy: Preliminary results. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1551-1561.
- Korkman M, Hilakivi-Clarke LA, Autti-Ramo I, Fellman V and Granstrom ML (1994) Cognitive impairments at two years of age after prenatal alcohol exposure or perinatal asphyxia. *Neuropediatrics* 25:101-105.
- Krahe TE, Wang W and Medina AE (2009) Phosphodiesterase inhibition increases CREB phosphorylation and restores orientation selectivity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *PLoS One* 4:e6643.
- Lendvai B, Zelles T, Rozsa B and Vizi ES (2003) A vinca alkaloid enhances morphological dynamics of dendritic spines of neocortical layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Res Bull* 59:257-260.
- May PA, Gossage JP, Kalberg WO, Robinson LK, Buckley D, Manning M and Hoyme HE (2009) 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.
- Medina AE (2010) Vinpocetine as a potent antiinflammatory agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9921-9922.
- Medina AE and Krahe TE (2008) Neocortical plasticity deficits in fetal alcohol spectrum disorders: lessons from barrel and visual cortex. *J Neurosci Res* 86:256-263.

- Medina AE, Krahe TE and Ramoa AS (2006) Restoration of neuronal plasticity by a phosphodiesterase type 1 inhibitor in a model of fetal alcohol exposure. *J Neurosci* 26:1057-1060.
- Melcer T, Gonzalez D, Barron S and Riley EP (1994) Hyperactivity in preweanling rats following postnatal alcohol exposure. *Alcohol* 11:41-45.
- Molnar P, Gaal L and Horvath C (1994) The impairment of long-term potentiation in rats with medial septal lesion and its restoration by cognition enhancers. *Neurobiology (Bp)* 2:255-266.
- O'Malley KD and Nanson J (2002) Clinical implications of a link between fetal alcohol spectrum disorder and attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry* 47:349-354.
- Paine TA, Neve RL and Carlezon WA, Jr. (2009) Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. *Neuropsychopharmacology* 34:2143-2155.
- Parkitna JR, Bilbao A, Rieker C, Engblom D, Piechota M, Nordheim A, Spanagel R and Schutz G (2010) Loss of the serum response factor in the dopamine system leads to hyperactivity. *FASEB J* 24:2427-2435.
- Paul AP, Pohl-Guimaraes F, Krahe TE, Filgueiras CC, Lantz CL, Colello RJ, Wang W and Medina AE (2010) Overexpression of serum response factor restores ocular dominance plasticity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *J Neurosci* 30:2513-2520.
- Premji S, Benzie K, Serrett K and Hayden KA (2007) Research-based interventions for children and youth with a Fetal Alcohol Spectrum Disorder: revealing the gap. *Child Care Health Dev* 33:389-397.
- Rema V and Ebner FF (1999) Effect of enriched environment rearing on impairments in cortical excitability and plasticity after prenatal alcohol exposure. *J Neurosci* 19:10993-11006.
- Riley EP and McGee CL (2005) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:357-365.
- Roberson R, Cameroni I, Toso L, Abebe D, Bissel S and Spong CY (2009) Alterations in phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element of binding protein activity: a pathway for fetal alcohol syndrome-related neurotoxicity. *Am J Obstet Gynecol* 200:193-195.
- Russell VA (2003) Dopamine hypofunction possibly results from a defect in glutamate-stimulated release of dopamine in the nucleus accumbens shell of a rat model for attention deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Biobehav Rev* 27:671-682.

- Russell VA (2007) Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurosci Methods* 161:185-198.
- Sari Y, Hammad LA, Saleh MM, Rebec GV and Mechref Y (2010) Alteration of selective neurotransmitters in fetal brains of prenatally alcohol-treated C57BL/6 mice: quantitative analysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Int J Dev Neurosci* 28:263-269.
- Savage DD, Queen SA, Sanchez CF, Paxton LL, Mahoney JC, Goodlett CR and West JR (1992) Prenatal ethanol exposure during the last third of gestation in rat reduces hippocampal NMDA agonist binding site density in 45-day-old offspring. *Alcohol* 9:37-41.
- Slawecki CJ, Thomas JD, Riley EP and Ehlers CL (2004) Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat. *Alcohol* 34:187-196.
- Steffensen SC, Wilson MC and Henriksen SJ (1996) Coloboma contiguous gene deletion encompassing Snap alters hippocampal plasticity. *Synapse* 22:281-289.
- Tsai SJ (2007) Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: clinical and therapeutic implications. *Med Hypotheses* 68:896-899.
- van der Kooij MA and Glennon JC (2007) Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31:597-618.
- Zucca S and Valenzuela CF (2010) Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca²⁺ channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 30:6776-6781.

Figure legends

Figure 1 - Mean (\pm SEM) of ambulation in the periphery of the open field of mice exposed to ethanol (ETOH) or saline (SALINE) from P2 (P1 = birth day) to P8 and treated with vinpocetine 10mg/kg (VP10), vinpocetine 20mg/kg (VP20) or vehicle (DMSO) at P30. Note that the neonatal exposure to ethanol increases locomotor activity in animals treated with vehicle solution and the treatment with 20 mg/kg of vinpocetine restores the locomotor activity to the control levels. FLSD: * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2 - Mean (\pm SEM) of cAMP levels in the hippocampus (A) and in the cortex (B) of mice exposed to ethanol (ETOH) or saline (SALINE) from P2 (P1 = birth day) to P8 and treated with vinpocetine 20mg/kg (VP20) or vehicle (DMSO) at P30. The treatment with vinpocetine increase cAMP levels both in the hippocampus and in the cortex. In the hippocampus, ethanol elicited a decrease in AMPc levels, which was restored by vinpocetine treatment. FLSD: * $P < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Table 1

Mean litter weights (g)				
	P2	P4	P6	P8
CONT	1.9 ± 0.9	2.7 ± 0.1	3.6 ± 1.6	4.6 ± 0.3
ETOH	2.1 ± 1.9	2.9 ± 0.1	3.8 ± 1.8	4.7 ± 0.2

Values represent means ± SEM

Figure 1

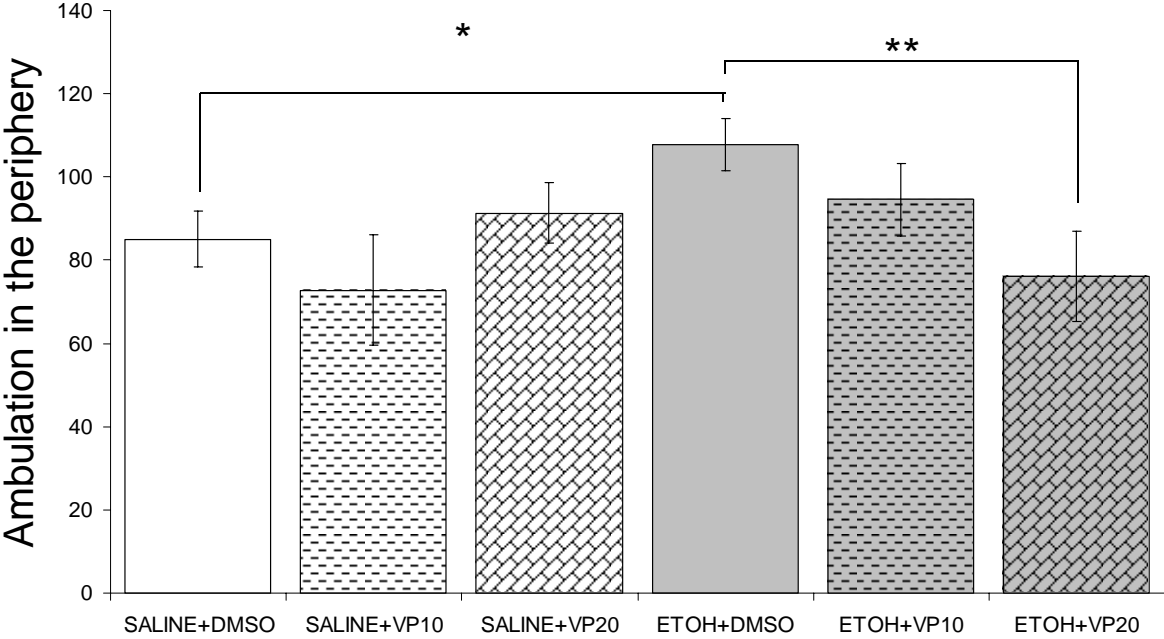


Figure 2

