



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Kélvia Carolina Ferreira Rosa

Efeitos da exposição precoce ao etanol na atividade locomotora e na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano de camundongos adolescentes em diferentes períodos do ciclo claro/escuro

Rio de Janeiro

2014

Kélvia Carolina Ferreira Rosa

Efeitos da exposição precoce ao etanol na atividade locomotora e na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano de camundongos adolescentes em diferentes períodos do ciclo claro/escuro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Rio de Janeiro

2014

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

R788 Rosa , Kélvia Carolina Ferreira.
Efeitos da exposição precoce ao etanol na atividade locomotora e na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano de camundongos adolescentes em diferentes períodos do ciclo claro/escuro / Kélvia Carolina Ferreira Rosa. – 2014
79 f. : il.

Orientador: Cláudio Carneiro Filgueiras.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Etanol - Teses. 2. Atividade motora. 3. Hipercinese. 4. Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade - Teses. 5. Transtornos Cronobiológicos. I. Filgueiras, Cláudio Carneiro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 611.132

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

Assinatura

Data

Kélvia Carolina Ferreira Rosa

Efeitos da exposição precoce ao etanol na atividade locomotora e na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano de camundongos adolescentes em diferentes períodos do ciclo claro/escuro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de março de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Profa. Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Jesus Landeira Fernandez

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que são meus maiores exemplos de vida, conquista e amor, meus melhores amigos e o melhor de mim. E à minha avó Maria Inêz que se impressionava e se orgulhava dos meus feitos com os ratinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Cláudio, que me inspira a alcançar o sonho de trabalhar com o que se gosta e de gostar do que se faz e, assim, não só conquistar colegas de trabalho, mas amigos. Com seu jeito extrovertido e sua parceria inabalável, só posso dizer: “Impossível dar ruim, tamo junto!!” Valeu mesmo Cláudio!!!! Aos professores Yael e Alex, por toda a colaboração, apoio, ajuda, suporte, conselho sempre que necessário.

Um agradecimento mais que especial ao meu grande amigo Mário, que me co-orientou nessa empreitada e me ensinou muito sobre os relógios da vida, e não somente os biológicos. Tudo tem seu tempo e, no fim temos tempo pra tudo. Mário, seu profissionalismo, sua parceria, sua paciência e perfeccionismo e acima de tudo sua sabedoria, me serviram demais como exemplo e tenha certeza que ouvi todos os seus conselhos e não me esquecerei.

Aos meus amigos de laboratório que fazem da pesquisa em neurociências algo muito mais interessante, divertido e prazeroso. Sem dúvida, as minhas melhores e maiores conquistas nestes anos de laboratório. Em especial à Jú VP, Póvis, Jú da Vila, Fabis, Moniquita, Fê, André, Monique, e todos que super curtiram meu sotaque e os “causos” de Queluz. Carlitcha e Pri, vocês, além de amigas, são meus exemplos de vitória, de sinceridade e de respeito, admiro e torço muito por cada conquista de vocês. Dani, minha colaboradora, “vizinha”(RS), obrigada pelo suporte, pelas perfusões de meia noite (RS), e por ter sido minhas mãos no trabalho nos momentos em que não pude estar presente.

Às minhas irmãs Dri catitu, Ferde, Cintião, Jubauba, Biones e Lice. Vocês são as peças fundamentais do meu quebra-cabeça, as melhores companhias, os melhores momentos, as melhores lembranças, as melhores amigas. Não me lembro de vida antes da Dri, de rir até cair sem a Fê, de um ano melhor que 2005 quando a peixe voltou, de puxões de orelha que me passem tanta força e segurança como os da Cin, de sintonia e conselhos mais intensos que os da Bia e de melhor companhia para seriados, comilanças e desabafos que a da Lice. Meninas, não sei dizer como seria a vida sem vocês, mas tenho certeza que não existirá minha vida sem vocês. Vocês sempre estarão presentes, nem que para isso eu pegue ônibus, taxi, avião, barco, ligue de madrugada, acorde às sete da manhã e durma às..sei lá, sou sempre a primeira a dormir, enfim, Deus não me fez filha única, pois me deu vocês.

À minha família que é única, especial e grande. Minha identidade, meu refúgio, meu tesouro. Avós, avôs, tias, tios, primas, primos, muito obrigada por estarem presentes em todos

os momentos, por fazerem questão de serem os melhores, e vocês são. Cada um com a sua contribuição, com seu carinho e atenção são parte de mim, parte da minha história, e parte do que busco ser.

Agradeço aos meus pais pelos ensinamentos, exemplos, conversas, paciência e pela falta dela em alguns momentos, o apoio, confiança, por esperarem sempre mais e o melhor de mim, por acreditarem e por fazerem o possível e o impossível para que eu alcance os meus sonhos, pelos mimos, pela atenção especial digna de uma filha única, pelo amor incondicional. Vocês estão no meu aprendizado, nas minhas conquistas, nas minhas escolhas, no caminho que decido seguir e, se hoje venço mais essa batalha o mérito é de vocês!!! Amo muito vocês!!!

E para finalizar, agradeço ao grande responsável por tudo isso, Deus. À fé que me guia, me conforta, me ensina e me faz querer ser sempre melhor.

Um homem se humilha se castram seu sonho,
Seu sonho é sua vida e a vida é o trabalho,
E sem o seu trabalho um homem não tem honra,
E sem a sua honra se morre, se mata
Não dá pra ser feliz.

Fagner

RESUMO

ROSA, Kélvia Carolina Ferreira. *Efeitos da exposição precoce ao etanol na atividade locomotora e na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano de camundongos adolescentes em diferentes períodos do ciclo claro/escuro*. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A hiperatividade locomotora e as alterações nos ritmos circadianos têm sido descritas em roedores e humanos expostos ao etanol durante o desenvolvimento. Considerando que a atividade locomotora em camundongos é conhecida por variar ao longo das fases do ciclo claro escuro, é possível que o fenótipo hiperativo resultante da exposição precoce ao etanol também varie em função da hora do dia. Além disso, é possível que a hiperatividade apresentada pelos indivíduos expostos ao etanol durante o desenvolvimento esteja associada com distúrbios no sistema de controle do ritmo circadiano. Neste estudo, avaliamos estas duas possibilidades realizando uma análise circadiana da atividade locomotora e da expressão dos genes de relógio de camundongos adolescentes expostos ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral. Para tanto, camundongos suíços criados e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 2:00h, apagadas às 14:00h) foram injetados com etanol (5g/kg ip, grupo ETOH) ou um volume equivalente de solução salina (grupo SAL) em dias alternados do segundo ao oitavo dias pós-natais. No 30º dia pós-natal, os animais foram testados em campo aberto por 15 minutos em diferentes momentos do ciclo claro/escuro: durante a fase clara entre 6:00 e 7:30h e entre 12:00 e 13:30h; durante a fase escura entre 18:00 e 19:30h e entre 0:00 e 01:30h. Durante a fase escura os testes foram realizados sob iluminação com luz vermelha. Após os testes comportamentais, alguns animais foram aleatoriamente selecionados para as análises de imunofluorescência da expressão dos genes PER 1, 2 e 3 no núcleo supraquiasmático. Ao longo dos seis primeiros minutos, a atividade locomotora dos animais testados durante o período claro não mudou significativamente ou apresentou um leve aumento e a dos animais testados no período escuro apresentou uma marcante redução. Além disso, o grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h apresentou a maior atividade locomotora e o grupo dos animais testados entre 12:00 e 13:30h apresentou a menor atividade locomotora. De modo importante, a exposição neonatal ao etanol promoveu hiperatividade locomotora apenas no grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h. Em relação aos genes de controle do ritmo circadiano, a exposição precoce ao etanol afetou apenas a expressão do gene *Per1* que foi menor entre 18:00 e 19:30h. O fato de que a expressão dos genes de controle do ritmo circadiano foi alterada no meio da fase escura e que a hiperatividade locomotora foi observada apenas no final da fase escura é compatível com a hipótese de que a hiperatividade induzida pelo etanol pode estar associada com as perturbações de controle do ritmo circadiano.

Palavras-chave: Álcool etílico. Gestação. Hiperatividade. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade locomotora (TDAH). Ritmo biológico. Genes de relógio.

ABSTRACT

ROSA, Kélvia Carolina Ferreira. *Effects of early ethanol exposure on locomotor activity and expression of genes controlling circadian rhythms of adolescent mice at different periods of light/dark cycle*. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Locomotor hyperactivity and alterations of circadian rhythmicity have been described both in rodents and in humans exposed to ethanol during development. Considering that spontaneous locomotor activity in mice is known to vary as a function of the time of the day, it is conceivable that the expression of the locomotor hyperactivity phenotype resulting from developmental ethanol exposure also varies throughout the day. In addition, it is possible that the hyperactivity presented by individuals early exposed to ethanol is associated with a dysfunction in the control system of the circadian rhythm. In this study, we tested these two possibilities by performing a circadian analysis of the locomotor activity and the expression of clock genes in adolescent mice exposed to ethanol during the brain growth spurt period. 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). From postnatal day 2 (PN2) to PN8, litters either received ethanol (5 μ l/g i.p., 25% in saline solution) or an equivalent volume of saline solution every other day. At PN30, locomotor activity was automatically assessed for 15 min in the open field test. During the light period, the animals were tested between 6:00 and 7:30 h or between 12:00 and 13:30 h whereas during the dark period the tests were performed between 18:00 and 19:30 h or between 0:00 and 1:30 h. During the dark period, the tests were conducted under red dim light illumination. After the behavioral tests, a sample of animals was randomly selected for the analysis by immunofluorescence of the expression of genes PER 1, 2 and 3 in the suprachiasmatic nucleus. Throughout the first 6 min, the locomotor activity of animals tested during the light period did not change or only increased slightly, while animals tested during the dark period presented a marked reduction. Furthermore, animals tested between 00:00 and 1:30 h presented the highest activity while animals tested between 12:00 and 13:30 h presented the lowest locomotor activity. Importantly, neonatal exposure to ethanol caused locomotor activity only in those animals tested between 00:00 and 1:30 h. As for the clock genes, neonatal exposure to ethanol only affected the PER 1 expression, which was lowest between 18:00 and 19:30. Our data is in line with the idea that locomotor activity varies as a function of the time of the day. The fact that the expression of a clock gene was altered in the middle of the dark cycle and that locomotor hyperactivity was observed only at the end of this period is compatible with the hypothesis that the hyperactivity observed as result of ethanol exposure is associated with alterations in the control of the circadian rhythm.

Keywords: Ethyl Alcohol. Hyperactivity. Attention-deficit–hyperactivity disorder (ADHD).

Biological rhythm. Clock genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representações esquemáticas da molécula de etanol.....	15
Figura 2 –	Representação do surto de crescimento neural em humanos e camundongos.....	20
Figura 3 –	Sistema de controle do ritmo circadiano.....	24
Figura 4 –	Representação do Núcleo Supraquiasmático e hipotálamo.....	24
Figura 5 –	Maquinaria molecular do relógio circadiano.....	26
Figura 6 –	Foto equipamento para teste de campo aberto.....	32
Figura 7 –	Imagens da técnica de imunofluorescência.....	35
Figura 8 –	Imagens da técnica de imunofluorescência.....	36
Figura 9 –	Médias (+EPM) do percentual de área marcada para o gene PER 1.....	48
Figura 10 –	Médias (+EPM) do percentual de área marcada para o gene PER 2.....	49
Figura 11 –	Médias (+EPM) do percentual de área marcada para o gene PER 3.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Médias (+EPM) da ambulação em diferentes horários.....	40
Gráfico 2 – Médias (+EPM) da ambulação dos animais ETOH ou SAL em diferentes horários.....	42
Gráfico 3 – Médias (+EPM) da ambulação sob luz branca ou luz vermelha.....	45
Gráfico 4 – Médias (+EPM) da ambulação dos animais expostos ao ETOH.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa corporal das ninhadas durante o período de exposição.....	38
Tabela 2 – Taxa de sobrevivência dos animais expostos ao etanol ou salina.....	39
Tabela 3 – Massa corporal das ninhadas durante o período de exposição.....	44

LISTA DE ABREVIACOES

AMP	adenosina monofosfato
ANOVA	análise de variância
ANOVA _r	análise de repetio
BSA	Bovine Serum Albumin
CCG	Clock-controlled gene
CREB	proteína de ligao ao elemento de resposta dependente de AMPc/Ca ⁺⁺
ETOH	Etanol
FASD	Fetal Alcohol Spectrum Disorder
GMP	guanosina monofosfato
PBS	Tampo fosfato em salina
PDE	fosfodiesterases
PN	dia de vida ps-natal
RC	Ritmo circadiano
SAL	Salina
SCN	Núcleo Supraquiasmático
TDAH	Transtorno de déficit de ateno e hiperatividade

SUMÁRIO

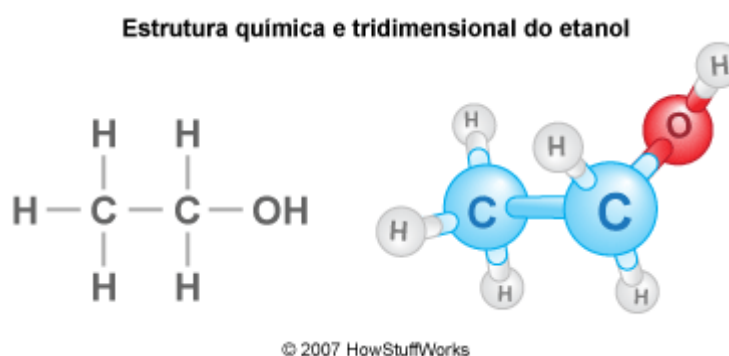
	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	29
2	METODOLOGIA	30
2.1	Animais	30
2.2	Exposição ao etanol ou salina	30
2.3	Análise da atividade locomotora	31
2.4	Análise de Imunofluorescência	32
2.4.1	<u>Fixação do cérebro por perfusão intracardíaca</u>	32
2.4.2	<u>Preparação dos cortes histológicos</u>	33
2.4.3	<u>Imunofluorescência</u>	34
2.4.4	<u>Análise dos cortes histológicos</u>	35
2.5	Avaliação do efeito da alteração da iluminação nos testes de campo aberto realizados durante o período escuro	36
2.6	Análise estatística	37
3	RESULTADOS	38
3.1	Massa corpórea	39
3.2	Taxa de sobrevivência	39
3.3	Atividade locomotora	39
3.4	Efeito da alteração da iluminação nos testes de campo aberto realizados durante o período escuro	43
3.4.1	<u>Massa corpórea e taxa de sobrevivência</u>	43
3.4.2	<u>Atividade locomotora</u>	44
3.5	Análise da expressão dos genes de controle circadiano	47
4	DISCUSSÃO	52
4.1	Resumo dos resultados	52
4.2	Via de administração do etanol	53
4.3	Ganho de peso e taxa de sobrevivência	54
4.4	Efeito do intervalo	55
4.5	Efeito do horário e da iluminação no comportamento ao longo do teste	56
4.6	Exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral	

	promove marcante hiperatividade.....	59
4.7	Apenas o grupo de animais testado no final da fase escura apresentou hiperatividade causada pelo etanol.....	61
4.8	Efeito da exposição precoce ao etanol na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano.....	63
4.9	A hiperatividade locomotora causada pela exposição precoce ao etanol pode estar associada com as perturbações do sistema de controle do ritmo circadiano do núcleo supraquiasmático.....	65
	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

INTRODUÇÃO

O etanol, também denominado álcool etílico, é o composto mais comum e mais amplamente utilizado da classe dos alcoóis, classificação química para compostos orgânicos que apresentam uma hidroxila ligada a um carbono e, por esse fato, é popularmente conhecido simplesmente como álcool.

Figura 1 - Representações esquemáticas da molécula de etanol



A importância do etanol e dos demais alcoóis para a humanidade é vastamente reconhecida, na indústria farmacêutica, de cosméticos, como combustível, e especialmente, em bebidas alcoólicas. O etanol é obtido, principalmente, a partir da fermentação de açúcares e seus efeitos alucinógenos são utilizados e apreciados desde a antiguidade (VIALA-ARTIGUES e Mechetti, 2003).

Porém, somente em 1952 durante a primeira edição do DSM-I (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) o alcoolismo passou a ser tratado como doença (VIALA-ARTIGUES e Mechetti, 2003). No ano de 1967, o conceito de doença do alcoolismo foi incorporado pela Organização Mundial de Saúde à Classificação Internacional das Doenças (CID-8), a partir da 8ª Conferência Mundial de Saúde (*Lexicon of alcohol and drug terms* – Organização Mundial de Saúde, 1994). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2 bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas no mundo e o uso prejudicial do álcool resulta na morte de 2,5 milhões de pessoas por ano. Ainda segundo a OMS, existem 60 tipos diferentes de doenças em que o álcool tem um papel significativo e

aproximadamente 76,3 milhões de pessoas apresentam algum distúrbio relacionado com o consumo de álcool (The World Health Report, 2004).

Um dado particularmente relevante e preocupante é que entre 13 e 20% das mulheres consomem bebidas alcoólicas durante a gestação (Balachova T. et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009; Senecky Y. et al., 2011). Como o etanol é um potente agente teratogênico e é capaz de atravessar a placenta livremente (Hannigan JH. e Berman RF., 2000; Welch-Carre E., 2005), são altos os riscos de dano (imediatos ou tardios) para o feto decorrentes do consumo do álcool pelas gestantes.

Aspectos históricos

Do ponto de vista histórico, os primeiros estudos que chamaram a atenção da comunidade científica para os efeitos teratogênicos do álcool foram realizados no início dos anos 70. Em 1973, Ken Jones, David Smith e colaboradores publicaram dois trabalhos descrevendo um conjunto de características comuns em 11 crianças cujas mães reconhecidamente consumiram grandes quantidades de álcool durante a gravidez (Jones KL. et al., 1973; Jones KL. e Smith DW., 1973). Estas características foram reunidas em três grandes grupos: 1) deficiência no crescimento e baixo peso; 2) malformações faciais como: nariz pequeno, lábio inferior fino, retração de pálpebras; e 3) danos no sistema nervoso central que incluem microcefalia e geralmente retardo mental. O conjunto destas características foi denominado por estes autores como Síndrome Alcoólica Fetal (FAS, do inglês *Fetal Alcohol Syndrome*).

Atualmente é bem aceita a ideia de que a FAS constitui a forma mais severa de dano causado pela exposição gestacional ao etanol, geralmente associado com o consumo abusivo de bebidas alcoólicas observado em alcoolistas (Goodlett CR. et al., 2005; Riley EP. e McGee CL., 2005). Em indivíduos cujas mães não são alcoolistas e, portanto, ingeriram quantidades menores de bebidas alcoólicas durante a gestação, os efeitos do etanol podem se manifestar de forma mais branda e de modo variado (geralmente como uma síndrome parcial, sem a presença das alterações craniofaciais, se limitando apenas a alguns distúrbios neurocomportamentais ou ao retardo de crescimento). Esta variedade de apresentações fez com que uma série de termos fossem utilizados para nomear os defeitos decorrentes da exposição ao etanol durante o período gestacional (Mukherjee et al., 2006; Rasmussen, 2005;

Spohr et al., 2007). Dentre os mais utilizados destacavam-se a Desordem Neurocomportamental Relacionada ao Álcool (ARND, do inglês *Alcohol Related Neurobehavioral Disorder*), Defeitos de Nascimento Relacionados ao Álcool (ARBD, do inglês *Alcohol-Related Birth Defects*) e Efeitos do Álcool no Feto (FAE, do inglês *Fetal Alcohol Effects*).

Em abril de 2004, durante um encontro da Organização Nacional de Síndrome Alcoólica Fetal (NOFAS, do inglês *National Organization on Fetal Alcohol Syndrome*) onde reuniram-se pesquisadores, representantes de agências governamentais como o NIH (*National Institutes of Health*) e o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e familiares de crianças portadoras da síndrome, definiu-se a sigla FASD (do inglês, *Fetal Alcohol Spectrum Disorder*). É importante mencionar que o termo FASD foi estabelecido por ser abrangente e compreender todos os distúrbios que podem ocorrer com os indivíduos que foram expostos ao etanol durante a gestação. Esses efeitos podem ser físicos, mentais e/ou comportamentais (Mukherjee et al., 2006; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007).

A FASD é um grave problema de saúde pública. A prevalência da FASD é estimada em 9 casos por 1000 nascimentos (May et al., 2009; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007), taxa esta que é duas vezes maior que a de síndrome de Down e Espinha bífida combinadas (May e Gossage, 2001; Rasmussen, 2005; Spohr et al., 2007). Quando as análises se restringem a crianças e adolescentes em idade escolar, a prevalência de FASD varia entre 2 a 5% (May et al., 2009; May et al., 2011; Riley et al., 2011).

Distúrbios neurocomportamentais da FASD

A exposição ao etanol durante a gestação produz um amplo espectro de defeitos neurológicos e comportamentais que podem persistir ao longo da vida (Hannigan e Armant, 2000; Spohr et al., 2007; Welch-Carre E., 2005). Diversas anormalidades cerebrais foram observadas em autópsias de indivíduos com FASD, entretanto, também podem ser identificadas por uma variedade de técnicas quantitativas de neuroimagem in vivo (Archibald et al., 2001; Clarren, 1986; McGee e Riley, 2006). Estudos *postmortem* em cérebros de crianças com FAS têm revelado alterações morfológicas como microencefalia, hidrocefalia, heterotopias neurogliais, anomalias ventriculares, agenesia do corpo caloso e malformações cerebelares (Clarren, 1986). Estudos de imagens demonstram, de forma consistente, uma

redução no volume dos lobos parietal, frontal e temporal. Indivíduos expostos precocemente ao etanol também apresentam uma desproporcionalidade volumétrica dos gânglios basais (McGee e Riley, 2006).

Dentre os distúrbios neurocomportamentais mais frequentemente observados estão o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Burd et al., 2003) e os déficits de aprendizado e memória (Acheson et al., 2001; Harris et al., 1995). O TDAH é possivelmente a característica mais marcante em crianças expostas ao álcool durante a gestação (Bhatara et al., 2006; Burd et al., 2003; Doig et al., 2008). Estima-se que a comorbidade das crianças diagnosticadas com FASD e TDAH é de cerca de 41% (Bhatara et al., 2006). Em crianças com FAS, a comorbidade com o TDAH varia entre 73% (Burd et al., 2003) e 95% (Fryer et al., 2007).

A manifestação dos efeitos deletérios da exposição pré-natal do sistema nervoso ao álcool pode variar de modo considerável entre indivíduos e entre estudos (Hannigan JH. e Berman RF., 2000; Stratton K. et al., 1996). De modo geral, o grau com que os déficits neurológicos e comportamentais se manifestam parece variar em função da quantidade de álcool consumida pela mãe, da frequência e/ou padrão de consumo e dos picos de concentração alcoólica no sangue (Klintsova et al., 2000). Além disso, fatores não associados à quantidade de álcool ingerido pela mãe durante a gestação como fatores de risco genéticos e o contato com outras substâncias como o fumo, cafeína e drogas (de abuso ou não) também podem interagir com o etanol ou exacerbar seus efeitos deletérios (Hannigan JH. e Berman RF., 2000; Hannigan et al., 2007).

Como se pode observar, os problemas decorrentes do abuso do álcool são alarmantes e crescentes. Apesar da utilização de programas públicos e privados de assistência e conscientização em diversos países para informar a respeito dos riscos do consumo de álcool durante a gestação não houve diminuição no número de casos com FASD nos últimos anos (Riley et al., 2011; Spohr et al., 2007). Estes dados indicam que, embora não beber durante a gravidez seja a melhor medida para evitar as sequelas da exposição precoce ao etanol, o investimento no desenvolvimento de tratamentos que mitiguem os efeitos deletérios desse teratígeno é de suma importância. Contudo, poucos grupos de pesquisa lidam diretamente com esta questão e ainda não existem tratamentos que possam reverter ou minimizar de modo eficiente os diversos distúrbios decorrentes da exposição gestacional ao álcool. Um dos fatores que, certamente, contribui para este quadro é o fato de que os mecanismos envolvidos com a manifestação da maioria dos distúrbios neurocomportamentais causados pela exposição precoce ao etanol permanecem pouco conhecidos.

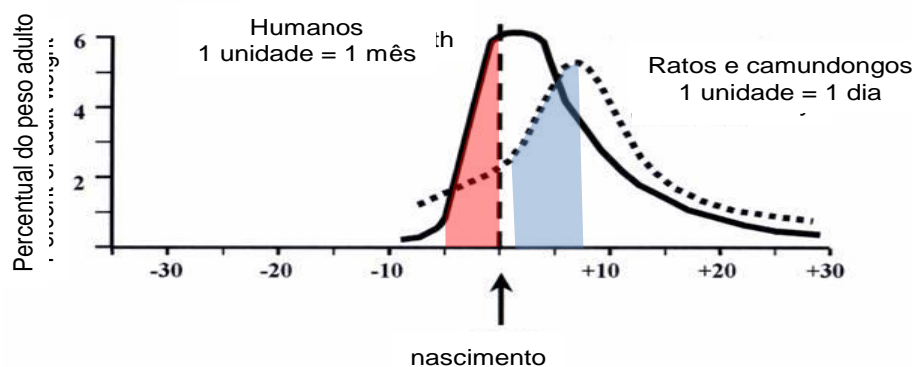
Desta forma, a existência de modelos animais para o estudo das consequências da exposição ao etanol durante o desenvolvimento abre grandes possibilidades de entender os mecanismos biológicos responsáveis pela teratogenicidade do etanol, o que é de fundamental importância para o desenvolvimento de tratamentos que possam reverter ou minimizar os diversos defeitos observados na FASD.

Roedores como modelo para o estudo da FASD

Os roedores estão entre as espécies mais utilizadas para investigar os mecanismos envolvidos com a teratogenicidade do etanol. Particularmente, ratos e camundongos apresentam uma série de comportamentos que são amplamente utilizados como ferramentas para estudar diversas condições neuropatológicas associadas com a exposição pré-natal ao álcool em humanos (Becker et al., 1996; Cudd, 2005; Hannigan, 1996). Além disso, os roedores são de fácil manutenção em laboratório, são bem conhecidos do ponto de vista biológico e atualmente existem diversas linhagens, principalmente de camundongos, transgênicas e *knockouts* com grande potencial para estudar os efeitos teratogênicos do álcool (Cudd, 2005; Suckow MA. et al., 2001).

Um aspecto que deve ser considerado para a utilização de ratos e camundongos como modelo da FASD é que, do ponto de vista de maturação do sistema nervoso, estas espécies nascem em um estágio do desenvolvimento mais precoce que os humanos. Alguns parâmetros como os picos de neurogênese, mielinização e chegada de aferentes têm sido utilizados para balizar o estágio de desenvolvimento de roedores e humanos (Bandeira et al., 2009; Dobbing e Sands, 1979). Contudo, um dos parâmetros mais utilizados em estudos neurotoxicológicos é o período de surto de crescimento neural (do inglês, *brain growth spurt*) (Dobbing e Sands, 1979). Este período é marcado por um súbito aumento na taxa de crescimento do cérebro, que nos estágios iniciais do desenvolvimento intrauterino aumenta de modo lento e progressivo e, repentinamente, cresce de modo exponencial durante certo período de tempo (Figura 2).

Figura 2 - Representação do surto de crescimento neural em humanos e camundongos



Em humanos, o surto de crescimento tem início no terceiro trimestre de gestação e atinge seu pico por volta do nascimento. Em camundongos este período se inicia no dia do nascimento e tem seu pico por volta do décimo dia pós-natal. Com base no período de surto de crescimento cerebral, vários autores têm considerado que, em ratos e camundongos, os primeiros 10 dias de vida pós-natal correspondem, do ponto de vista de desenvolvimento neural, ao período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Dobbing e Sands, 1979; Nunes et al., 2011). Durante o surto de crescimento cerebral de humanos e roedores, algumas estruturas, como o neocórtex, o hipocampo e o cerebelo, estão em um período de intensa sinaptogênese e esta característica torna o sistema nervoso especialmente vulnerável ao contato com substâncias neurotóxicas (Dobbing e Sands, 1979; Hannigan e Armant, 2000; Spohr et al., 2007; Welch-Carre E., 2005).

Alterações neurocomportamentais em roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento

Os estudos realizados em roedores têm possibilitado um bom avanço na compreensão da fisiopatologia e dos fatores de risco associados com a exposição precoce ao etanol (Becker et al., 1996; Cudd, 2005; Hannigan JH. e Berman RF., 2000; Hannigan, 1996). Assim como

os humanos, roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento apresentam retardo de crescimento, anomalias crânio-faciais e uma série de distúrbios neurocomportamentais como a hiperatividade locomotora (Gilbertson e Barron, 2005; Melcer et al., 1994; Tran et al., 2000) e déficits de aprendizado e memória (Becker et al., 1996; Berman e Hannigan, 2000).

Estudos em roedores sugerem que o tipo de anomalia provocada pelo etanol depende da linhagem estudada, quantidade consumida e do momento do desenvolvimento em que ocorre a exposição (Becker et al., 1996; Hannigan, 1996). Por exemplo, camundongos expostos a uma única dose de etanol no 7º dia de gestação apresentam defeitos crânio-faciais semelhantes aos observados em crianças com FAS que incluem olhos com fissuras palpebrais curtas, hipoplasia na porção média da face, narina reduzida, lábio superior bem mais fino que o inferior e o *philtrum* achatado (Sulik, 2005). Em um estudo em que uma solução de etanol (4,8%) foi utilizada como única fonte de água a qual fêmeas grávidas das sublinhagens de camundongos C57BL/B6J e C57BL/6NHsd tiveram acesso entre o 7º e o 16º dia de gestação, mostrou que as fêmeas C57BL/6NHsd beberam maior quantidade de etanol, tiveram níveis de etanol em sangue superiores e seus filhotes apresentaram no 17º dia de gestação um número significativamente maior de alterações craniofaciais quando comparadas as fêmeas C57BL/B6J (Anthony et al., 2010).

De modo geral, testes comportamentais têm sido desenvolvidos em roedores com o intuito de simular os três principais sintomas do TDAH (impulsividade, desatenção e hiperatividade) (Sagvolden et al., 2005). Contudo, o registro da hiperatividade locomotora em testes de campo aberto é, de longe, o mais amplamente estudado em roedores expostos ao etanol durante o desenvolvimento (Kelly et al., 1987; Melcer et al., 1994; Riley et al., 1993; Sagvolden et al., 2005; Slawecki et al., 2004; Thomas et al., 2001; Thomas et al., 2007). Além da simplicidade, a medida da distância percorrida por ratos ou camundongos em testes de campo aberto tem se mostrado uma ferramenta importante no estudo de vários aspectos do comportamento, genética e neurobiologia do TDAH (Lalonde e Strazielle, 2009; Sagvolden et al., 2005). A hiperatividade locomotora é uma característica comumente observada em várias linhagens endogâmicas, *knockouts* e transgênicas de roedores que normalmente são utilizadas como modelos de TDAH (Russell, 2007; Sagvolden et al., 2005).

De particular interesse para este estudo, trabalhos realizados por diversos grupos de pesquisa vêm demonstrando de modo consistente que, em ratos e camundongos, o período de surto de crescimento cerebral é um período crítico para a manifestação da hiperatividade locomotora causada pelo etanol (Kelly et al., 1987; Melcer et al., 1994; Nunes et al., 2011; Riley et al., 1993; Slawecki et al., 2004; Thomas et al., 2001). Durante este período, que

corresponde aos 10 primeiros dias de vida pós-natal em ratos e camundongos, uma das consequências mais notáveis da exposição ao etanol é um grande aumento na morte neuronal por apoptose em diversas regiões cerebrais (Ikonomidou et al., 2000; Olney, 2004). De modo geral, o aumento da apoptose em estruturas como o neocórtex, o hipocampo e o cerebelo tem sido apontada como um fator preponderante na manifestação de transtornos neurocomportamentais decorrentes da exposição ao etanol durante o desenvolvimento como a hiperatividade locomotora (Han et al., 2005; Ieraci e Herrera, 2007; Medina, 2011; Wozniak et al., 2004).

Nos últimos anos, contudo, um número crescente de estudos vem demonstrando que a exposição precoce ao etanol afeta o desenvolvimento de outras estruturas cerebrais que podem contribuir para a manifestação dos transtornos neurocomportamentais normalmente observados na FASD. Dentre estas estruturas, destaca-se o núcleo supraquiasmático do hipotálamo que exerce um papel central na manutenção dos ritmos circadianos e sincronização de um grande número de processos fisiológicos (Agapito et al., 2010; Allen et al., 2004; Allen et al., 2005a; Allen et al., 2005b; Farnell et al., 2008; Farnell et al., 2009; Handa et al., 2007). Particularmente, ratos expostos ao etanol durante o desenvolvimento apresentam mudanças no padrão circadiano de oscilação da atividade locomotora espontânea (Allen et al., 2005a) e no controle da temperatura corpórea e da secreção de corticosterona (Handa et al., 2007). Estas alterações fisiológicas têm sido associadas a alterações na produção de fatores neurotróficos (Allen et al., 2004; Farnell et al., 2009) e na expressão de vários genes que controlam o ritmo circadiano (Agapito et al., 2010; Farnell et al., 2008) causadas pelo etanol em neurônios do núcleo supraquiasmático.

O Núcleo supraquiasmático e os sistemas de controle do ritmo circadiano

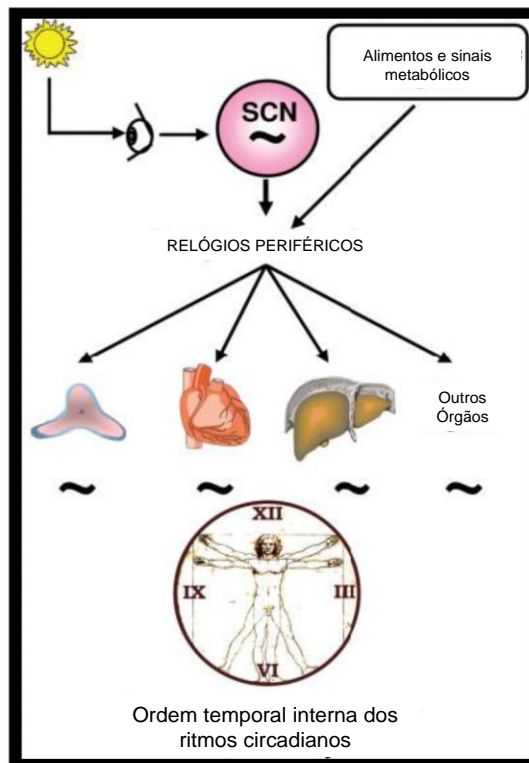
Os ritmos biológicos são produto da interação existente entre o indivíduo e o meio e são coordenados por diferentes ciclos externos, como por exemplo, o sol, a lua e as estações do ano. Desta forma, os ciclos endógenos são coordenados por relógios biológicos que determinam em nosso organismo ritmos específicos em fase com a natureza. A rotação da Terra em torno de seu próprio eixo dura 24 horas e determina ciclos claros e escuros dentro desse período. Com o passar do tempo, os seres vivos desenvolveram habilidades para interpretar estes ciclos e associar de modo adequado algumas de suas atividades ao período

claro (dia) e outras ao período escuro (noite), portanto, foi possível assegurar que os processos fisiológicos aconteçam de maneira sincronizada e durante o momento mais apropriado do dia ou da noite (Panda S. et al., 2002). Em mamíferos, o ritmo circadiano tem influência sobre quase todos os aspectos fisiológicos e comportamentais como, sono e vigília, atividade cardiovascular, sistema endócrino, temperatura corporal, atividade renal, fisiologia do trato gastrointestinal, metabolismo hepático, etc (Panda S. et al., 2002; Reppert SM. e Weaver DR., 2002).

O ritmo circadiano desses animais é organizado da seguinte maneira: os chamados relógios periféricos se localizam em diversos tecidos do corpo e atuam em sincronia com o relógio central localizado no núcleo supraquiasmático, esse por sua vez, coordena os demais relógios fazendo com que ocorra uma troca de informação entre eles (Figura 3). Este núcleo, localizado bilateralmente na base do hipotálamo, recebe (por meio do feixe nervoso retino-hipotalâmico) informação da luminosidade do ambiente. Propriedades essenciais do sinal luminoso como a duração e intensidade dos períodos, a duração das transições dia-noite e noite-dia (que dependem da estação do ano e da latitude) e a composição espectral da luz influenciam a função do núcleo supraquiasmático (Comas M. e Hut RA, 2009) que age como um relógio geneticamente determinado, que sincroniza a ordem temporal interna com o ciclo claro/escuro dado pelo movimento de rotação da terra em relação ao sol (Weaver, 1998).

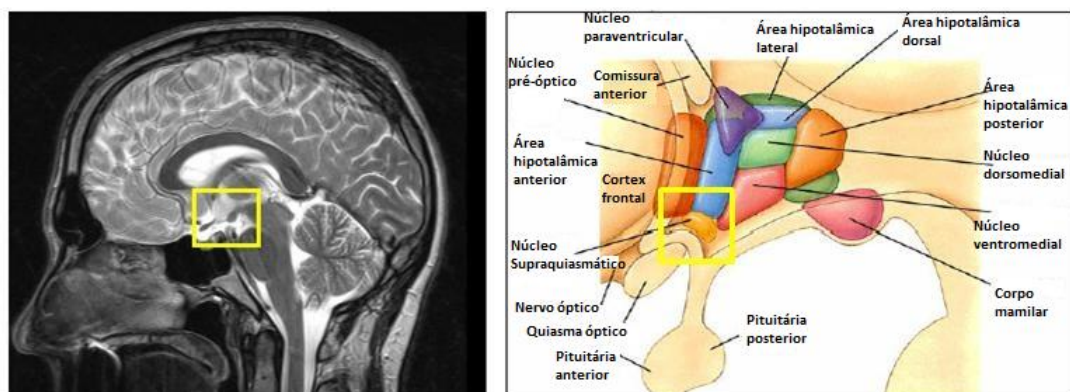
O núcleo supraquiasmático e os relógios periféricos atuam por meio de um circuito comum de transcrição de genes (genes de relógio) que gera os padrões rítmicos que regulam a sua própria expressão e a expressão de outros genes (genes controlados por relógio) que estão envolvidos na expressão, metabolismo, e/ou função de uma série de proteínas, dependendo da célula ou órgão. Em insetos e em mamíferos, os ritmos circadianos resultam da atuação de relógios controlados por tais genes relógios que geram ritmicidade e distribuição de sinais temporais, ajustando os ritmos internos em fase com ritmos externos (*zeitgeber*, do alemão, *zeit* = tempo; *geber* = doador), num processo chamado “entrainment”. Além dos ritmos diretamente controlados pelo núcleo supraquiasmático, sabe-se hoje que células de diferentes órgãos como fígado, pulmão e rins contêm seus osciladores circadianos próprios e são capazes de gerar os ritmos circadianos, quando isolados do organismo e cultivados *in vitro* (Yamazaki et al., 2000). As bases moleculares da associação entre os relógios centrais e os periféricos são, entretanto pouco conhecidas.

Figura 3 - Sistema de controle do ritmo circadiano



Legenda: Representação esquemática da organização funcional do sistema de controle do ritmo circadiano. O núcleo Supraquiasmático é o relógio central que se relaciona com os demais relógios periféricos.

Figura 4 – Representação do Núcleo Supraquiasmático e hipotálamo



Legenda: O núcleo supraquiasmático (no centro do quadrado) em uma imagem de ressonância magnética (esquerda) e em uma representação esquemática com os outros núcleos hipotalâmicos (direita).

Atualmente, é bem aceito que, em termos moleculares, o controle da expressão do ritmo circadiano envolve regulação celular através dos genes do relógio biológico (Albrecht e

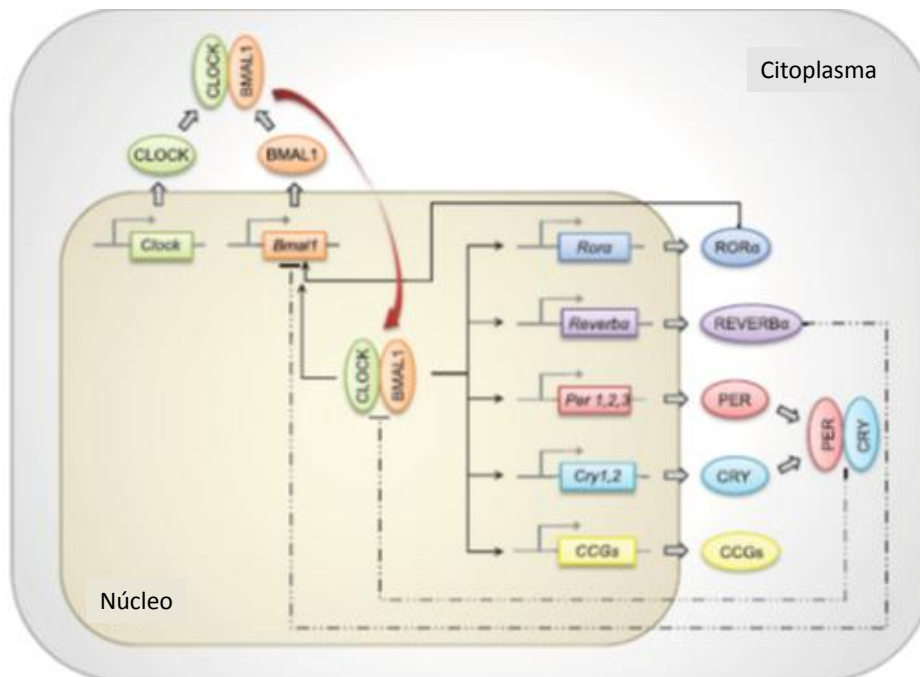
Eichele, 2003; van Esseveldt et al., 2000). Esses genes codificam uma família de proteínas auto-reguladas por um mecanismo de feedback positivo e alças de feedback negativo da transcrição que ocorrem em ciclos de 24 horas (Albrecht e Eichele, 2003).

As investigações genéticas e moleculares do ritmo circadiano em mamíferos demonstraram inicialmente a existência de um gene denominado CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) basicamente temporizador (Vitaterna et al., 1994). Sucessivamente, foi descoberto o gene BMAL1 que também é um temporizador, e que se une ao CLOCK formando um heterodímero, responsável pela transcrição dos genes: Period1 (Per1), Period2 (Per2), Period3 (Per3), Cry1 (Cryptochrome 1) e Cry2 (Cryptochrome 2). Os genes Per1 e Per2 apresentam diferentes respostas a pulsos de luz enquanto o Per3 é independente da luz (Pereira et al., 2009). Este complexo gênico situa-se no núcleo supraquiasmático e atua na periodicidade dos ritmos circadianos. Em relação à mecânica molecular, sabe-se que os genes CLOCK e BMAL1 possuem domínio chamado basic-heliloop-helix, que permite a interação destes genes com a molécula de DNA. Ou seja, o heterodímero uma vez formado possui capacidade de ligação com o DNA e age como um fator de transcrição para os outros genes relógio. Desta forma, foi proposta uma alça de retroalimentação negativa, que envolve a transcrição e tradução de todos os genes relógio, atuando como reguladora dos ritmos circadianos. Em resumo, o heterodímero formado pelas proteínas CLOCK/BMAL1, promove a transcrição dos genes Per1, Per2, Per3, Cry1 e Cry2. As proteínas codificadas por estes genes, uma vez sintetizadas, formam dímeros (PER-CRY) no citoplasma que, a partir de determinada concentração, retornam ao núcleo, bloqueando a ação do heterodímero CLOCK/Bmal1 na transcrição dos próprios genes, formando assim uma alça de retroalimentação negativa de transcrição e tradução, que dura aproximadamente 24 horas. Outros genes têm sido descobertos e possuem como função estabilizar e realizar o controle fino do processo de temporização (Takumi et al., 1998).

Na maquinaria molecular do relógio circadiano, além dos genes Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2 também são conhecidos: *Reverba* (reverse erythroblastosis virus α) e *Rora* (retinoid-related orphan receptor- α); dentre outros, representados pelos CCGs (clock-controlled genes) (figura 5). O heterodímero CLOCK /BMAL1 viabiliza a transcrição destes genes. O feedback negativo é regulado pela associação de CRYs e PERs, que também formam um heterodímero no citoplasma. Ao penetrarem no núcleo, por força de concentração citoplasmática, inibem a transcrição e atividade de CLOCK/BMAL1 e conseqüentemente a produção de PERs e CRYs (Zanquetta et al., 2010). Receptores nucleares *Reverba* e *Rora* participam na regulação da expressão de BMAL1, inibindo ou ativando a transcrição,

respectivamente (Froy, 2010); a expressão gênica de *Bmal1* também é regulada por *Reverba* (inibição) e *Rora* (estimulação), que concorrem para o mesmo elemento *Rora* presentes no promotor *BMAL1*. A regulação da expressão dos CCGs do relógio circadiano confere ritmicidade a uma variedade de processos moleculares e fisiológicos.

Figura 5 - Maquinaria molecular do relógio circadiano



Legenda: As linhas retas representam estimulação. As linhas tracejadas, inibição.
Fonte: (Zanquetta et al., 2010)

De modo interessante, defeitos nos mecanismos acima podem ser responsáveis pela desincronização dos ritmos internos com o meio gerando uma dificuldade de manutenção da homeostase ou até mesmo um processo patológico. Em acordo com esta ideia, pesquisas recentes sugerem que os genes controladores do ritmo circadiano, bem como suas variantes (polimorfismos de nucleotídeo único) contribuem para a manifestação de algumas desordens psiquiátricas em crianças e adolescentes, como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), transtornos do humor (depressão e transtorno bipolar), esquizofrenia e ansiedade (Dueck A. et al., 2012).

Associação entre a disfunção dos sistemas de controle do ritmo circadiano, o TDAH e a hiperatividade induzida pela exposição ao etanol durante o desenvolvimento

Nos últimos anos, um número crescente de estudos vem demonstrando alterações de ritmo circadiano em indivíduos com TDAH. Comparadas a controles, crianças com TDAH apresentam um aumento da atividade durante o dia (principalmente no início da tarde), mas não apresentam este aumento durante a noite (Imeraj et al., 2011). Em estudos que avaliam o comportamento durante o sono, crianças com TDAH exibem um aumento significativo da atividade motora durante as primeiras horas da noite, logo após as luzes se apagarem durante o período de indução do sono (Ironsides et al., 2010). Atrasos no início e término do período de sono associados a atrasos na produção de melatonina também foram observados em crianças e adultos com TDAH (Bijlenga et al., 2013; van der Heijden et al., 2005; Van Veen et al., 2010). Algumas anormalidades na secreção de cortisol foram verificadas em crianças com TDAH (Blomqvist et al., 2007; Kaneko et al., 1993), mas não foram encontradas em adultos com TDAH (Guilding e Piggins, 2007).

Alterações nos genes de controle do ritmo circadiano têm sido descritas nos indivíduos com TDAH. Polimorfismos no gene CLOCK são um fator de risco para o TDAH, tanto em adultos (Kissling et al., 2008) como em crianças (Xu et al., 2010). Um estudo mais recente demonstrou que o ritmo de expressão dos genes BMAL1 e PER2 é reduzido e os níveis de cortisol apresentam uma alteração em seu ritmo em adultos com TDAH (Blagrove et al., 2012). Polimorfismos no gene Per2 também têm sido descritos em jovens com TDAH (Brookes et al., 2006).

Em roedores, alterações de ritmo circadiano têm sido associadas com a hiperatividade locomotora. Hamsters adultos submetidos a uma dieta insuficiente em ácidos graxos poli-insaturados desde o início da gestação apresentaram, quando comparados aos controles, hiperatividade locomotora e uma redução de 52% nos picos noturnos de melatonina (Lavialle et al., 2008). Ratos Wiggling com idades entre 12 a 14 semanas apresentaram uma hiperatividade locomotora mais proeminente durante a noite (Masuo et al., 2007). Em contraste, ratos adolescentes expostos ao bisphenol-A no 5º dia pós-natal apresentaram uma hiperatividade locomotora que foi mais acentuada durante a fase clara do ciclo circadiano do que durante a fase escura (Kiguchi et al., 2008).

Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que distúrbios no sistema de controle do ritmo circadiano podem contribuir para a manifestação dos transtornos neurocomportamentais observados no TDAH, em particular a hiperatividade locomotora. Este dado é particularmente importante se considerarmos que a exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral que causa uma marcante hiperatividade locomotora (Gilbertson e Barron, 2005; Melcer et al., 1994; Nunes et al., 2011; Tran et al., 2000) e também é capaz de afetar a função do núcleo supraquiasmático e dos sistemas de controle do ritmo circadiano. Particularmente, ratos expostos ao etanol durante o desenvolvimento apresentam mudanças no padrão circadiano de oscilação da atividade locomotora espontânea (Allen et al., 2005a; Earnest et al., 2001; Farnell et al., 2008; Sakata-Haga et al., 2006).

Desta forma, é possível que os distúrbios nos sistemas de controle no ritmo estejam associados à manifestação da hiperatividade locomotora causada pela exposição precoce ao etanol, contudo, esta hipótese, ainda que plausível, carece de suporte experimental capaz de validá-la.

1 OBJETIVOS

Considerando a necessidade de se compreender melhor os mecanismos envolvidos com a manifestação dos efeitos deletérios da exposição ao etanol durante o desenvolvimento do sistema nervoso e que os déficits neurocomportamentais observados na FASD como a hiperatividade locomotora podem estar associados com alterações no sistema de controle do ritmo circadiano os principais objetivos deste projeto foram:

- a) Avaliar os efeitos da exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral na atividade locomotora medida em diferentes períodos do ciclo circadiano;
- b) Avaliar se a exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral afeta a expressão de proteínas dos genes de controle do ritmo circadiano PER 1, PER 2 e PER 3 (*Clock gens*) em diferentes horários.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Esse estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/002/2014). Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com a declaração de Helsinque e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde.

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

2.2 Exposição ao etanol ou salina

No dia do nascimento (PN1), as ninhadas foram designadas para receber uma injeção ip de 5 µl/g de etanol (25% em salina) constituindo o grupo exposto ao álcool (ETOH, 186 animais, provenientes de 14 ninhadas) ou receberam uma injeção ip de 5 µl/g de solução de NaCl a 9% formando o grupo controle (SAL, 174 animais provenientes de 12 ninhadas). As injeções foram feitas, alternadamente, do segundo dia pós-natal (PN2) ao oitavo dia pós-natal (PN8), ou seja, em PN2, PN4, PN6 e PN8.

Após as injeções, os filhotes eram recolocados em uma caixa com maravalha onde permaneciam por um período aproximado de 10 minutos até serem devolvidos à progenitora. Com base no risco de lesão dos órgãos da cavidade abdominal, utilizamos uma agulha de calibre 28. A agulha era cuidadosamente inserida apenas para penetrar na parede abdominal e chegar à cavidade peritoneal. Para minimizar o vazamento pelo local da injeção a agulha era retirada lentamente da cavidade abdominal.

A dose de etanol foi escolhida baseada em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Filgueiras et al., 2009; Nunes et al., 2011) que utilizaram a mesma dose e geraram níveis de etanol em soro semelhantes àqueles 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 e abusivo de etanol (*binge drinking*) em humanos, o qual está associado a severos danos cognitivos e a déficits comportamentais (Maier e West, 2001).

Estudos realizados por nosso grupo utilizando este protocolo de administração de etanol demonstraram que aproximadamente 90% dos animais injetados com etanol sobrevivem até a idade dos testes (Filgueiras et al., 2009; Nunes et al., 2011). A taxa de sobrevivência foi calculada para cada ninhada pela razão entre o número de animais vivos no dia do teste e o número de animais observados em PN2.

Ao completarem 21 dias de vida (PN21) os animais foram desmamados e separados em gaiolas de acordo com os horários em que seriam submetidos ao teste de campo aberto (mínimo de 2 animais, máximo de 5 animais por gaiola).

2.3 Análise da atividade locomotora

Em PN30, a atividade locomotora espontânea foi avaliada automaticamente em um monitor de atividade (EP-149, Insight, SP), que consistiu em uma caixa de acrílico ($46.5 \times 46.5 \times 35$ cm) equipada com duas barras paralelas contendo 16 pares de emissores e sensores de infravermelho alinhados e posicionados a 1,5 cm do chão (Figura 6). A distância percorrida pelos animais, parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora espontânea, foi calculada automaticamente por um computador conectado ao monitor de atividade a partir da contagem do número de interrupções dos feixes de infravermelho. A distância percorrida pelos animais foi registrada em intervalos de 1 minuto durante um período de 15 minutos.

Para a realização do teste, cada camundongo foi individualmente colocado no centro da arena. No final de cada sessão, o animal era retirado do monitor de atividade e, antes do próximo animal ser colocado na arena, o chão e as paredes eram limpos com toalha de papel descartável levemente embebida com solução de 40% de álcool.

Figura 6 - Foto do equipamento para teste de campo aberto



Os animais de cada uma das ninhadas foram submetidos ao teste de campo em um dos seguintes horários: durante o período claro, os animais foram testados entre 6:00 e 7:30h ou entre 12:00 e 13:30h e durante o período escuro os testes foram realizados entre 18:00 e 19:30h ou entre 0:00 e 01:30h. Durante o período escuro, os animais foram manipulados e testados sobre iluminação com luz vermelha ($\lambda > 620\text{nm}$). A temperatura foi mantida por volta de 22°C.

2.4 Análise de Imunofluorescência

2.4.1 Fixação do cérebro por perfusão intracardíaca

Imediatamente após os testes comportamentais, uma parte dos animais de cada ninhada (no máximo 3 machos e 3 fêmeas por ninhada e horário) foram imediatamente anestesiados profundamente com Avertin e perfundidos por via intracardíaca. Neste procedimento, a cavidade torácica foi exposta e o pericárdio e timo extraído, para facilitar a introdução do scalp 21G, na extremidade inferior do ventrículo esquerdo dos animais. Logo após a introdução do scalp, foi rompida a parede do átrio direito dos animais e então, a bomba peristáltica MasterFlex L/S (Coole Parmer, USA) foi ligada em fluxo de gotejamento (4mL/min) com solução de NaCl 0,9%. Os animais foram submetidos a esta solução por cerca

de cinco minutos, ou até que seu fígado e pulmões apresentassem perda acentuada de coloração. Neste momento, procurou-se observar a ocorrência de extravasamento de líquido pelas narinas do espécime, o que indicava que a pequena circulação estava recebendo a perfusão, em detrimento da rede vascular cerebral. Neste caso procurou-se a correção do procedimento com a acomodação do scalp na aorta e oclusão das vias respiratórias dos animais, visando aumentar a pressão vascular da pequena circulação. Em seguida, a solução de salina foi substituída por uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4. A observação da contração de músculos da face indicava a preservação da circulação cerebral, que passava a receber o fixador durante os dez minutos seguintes. Finalmente, os animais foram submetidos à perfusão de solução de sacarose 10% em solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, durante cinco minutos.

Finda a perfusão, os cérebros foram cuidadosamente extraídos e imersos em solução de sacarose 10% em paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 durante duas horas, quando então eram imersos em solução de sacarose 20% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 durante a noite.

2.4.2 Preparação dos cortes histológicos

O corte dos cérebros foi realizado em criomicrotomo (HYRAX C 25, ZEISS) regulado para obtenção de cortes de 20 micrometros de espessura. Para isto, os cérebros foram incluídos em meio para cortes congelados OCT (do inglês: *Optimal Cutting Temperature*; Tissue-Tek 4583, Sakura, USA), congelando em nitrogênio líquido durante a inclusão. Os cérebros foram montados de modo a permitir a obtenção de cortes coronais a partir da parte frontal do cérebro. Com o auxílio de um atlas estereotáxico (Paxinos G., Franklin K., 1996) o espécime foi alinhado, de modo a fornecer cortes coronais de porções equivalentes dos dois hemisférios cerebrais. Os cortes foram desprezados até o surgimento do núcleo supraquiasmático na região hipotalâmica do cérebro (de Bregma - 0,22 mm a Bregma - 0,82 mm). A partir daí, os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas de modo seriado. Dispostos em dois cortes por lâmina. Cada um foi recolhido sequencialmente em uma posição da lâmina, permitindo que cada lâmina contivesse regiões semelhantes do núcleo supraquiasmático (SCN).

As lâminas serialmente numeradas foram embrulhadas em pacotes de papel laminado e armazenadas em freezer a -20°C . A expressão dos *Clock gens*: PER 1,2,3 no hipotálamo dos animais, foi avaliada em diferentes tratamentos (ETOH ou SAL) sob diferentes horários e iluminação.

2.4.3 Imunofluorescência

A imunomarcção para a identificação dos *Clock gens* foi feita em cortes de regiões semelhantes do SCN e a marcação foi feita em um mesmo momento para todos os cortes. A marcação de PER 1,2,3 foi feita, respectivamente com o uso do anticorpo primário PER1 N-20; PER2 E -20; PER3 T-20 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) diluição 1:200. A contra-marcação para a localização das células foi feita com o uso de DAPI (Sigma-Aldrich) diluição 1:5000. A montagem das lâminas foi realizada com o uso do Prolong Antifade (Invitrogen).

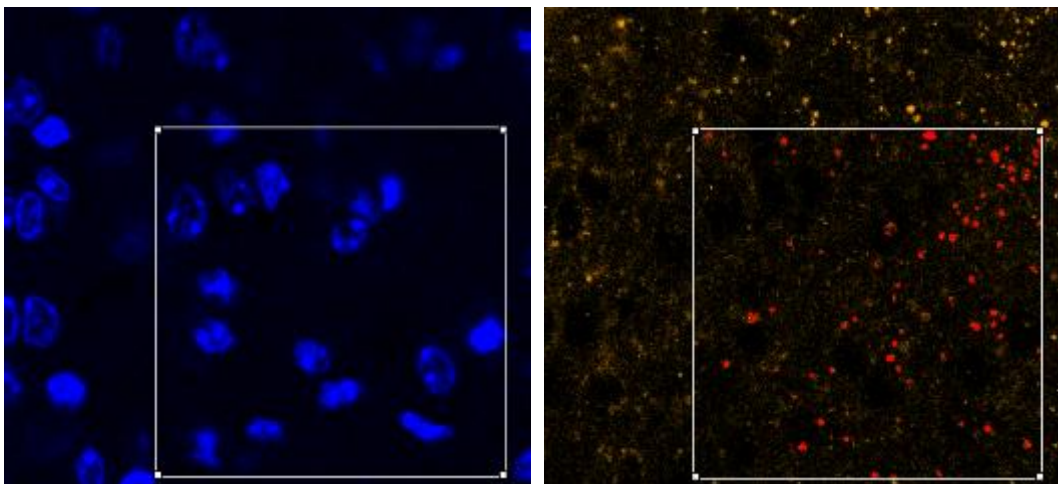
Para todas as marcações, foi usado anticorpo primário diluído em BSA (*do inglês: Bovine Serum Albumin*) e DAPI diluído em água destilada. Dispostas em bandeja de análise histológica, uma lâminas de cada espécime, contendo 4 cortes de regiões do núcleo supraquiasmático, foram usadas para cada marcação. Cada corte foi fixado com acetona a -20°C por quinze minutos e recebeu três lavagens de cinco minutos cada, com triton X-100 0,5% em tampão fosfato diluído em salina (PBS), pH 7,4. Posteriormente, os cortes receberam três lavagens de cinco minutos, primeiro de PBS 1X, após mais três lavagens de PBS/BSA 1%. Os cortes receberam PBS/BSA 5% durante uma hora. Após a retirada do PBS, cada corte recebeu 30 μL do anticorpo primário e foram colocados overnight em geladeira a 4°C .

No dia seguinte, os cortes foram submetidos a uma lavagem de vinte minutos cada com PBS/BSA 5%; três lavagens de cinco minutos com PBS/BSA 1% e incubados com anticorpo secundário anti-*goat* 1:400 diluído em PBS/BSA 1% conjugado com fluoróforo Alexa 546 (Invitrogen) por 60 minutos. Em seguida foram submetidos a seis lavagens de cinco minutos cada com PBS pH 7,4, três lavagens de dois minutos com água destilada e, em seguida foram marcados com DAPI e novamente lavados com água destilada. As lâminas foram secas com papel filtro, e montadas com Prolong Antifade e seladas com esmalte.

2.4.4 Análise dos cortes histológicos

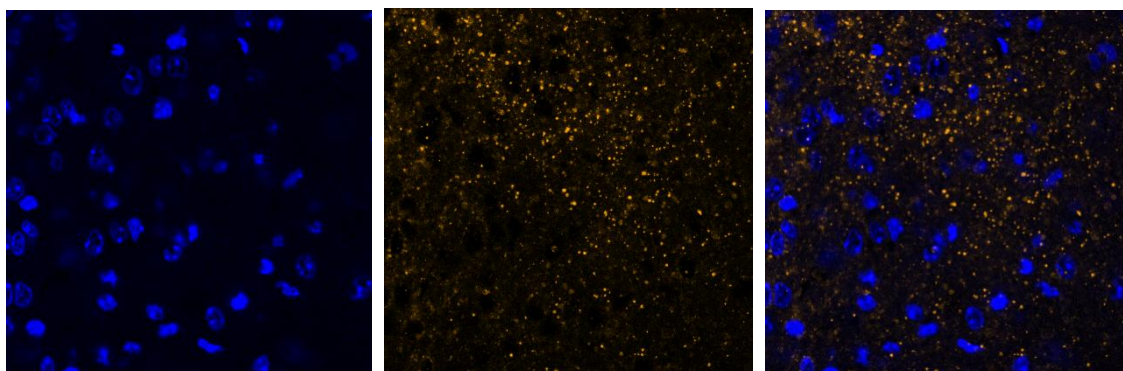
As laminas foram observadas em microscópio confocal Zeiss 510 Meta (Laboratório de Microscopia Eletrônica Prof. Luiz Henrique Monteiro Leal LABMEL/UERJ /IBRAG). Em objetiva de 63x, foram obtidas imagens de áreas semelhantes, identificadas próximo ao terceiro ventrículo da região do SCN de cada corte. As imagens histológicas coletadas foram analisadas quantitativamente com o auxílio do software Image Pro Plus (Media Cybernetics, USA) sendo os dados expressos sob a forma de percentual de área imunomarcada ocupada no campo. Cada animal foi representado por três campos e para cada campo escolhemos cinco áreas de interesse baseados na marcação do DAPI, marcador de DNA, que delimita o núcleo das células (figura 7). Estas áreas de interesse, reposicionadas precisamente nas imagens das proteínas estudadas, forneceram os dados sobre a área relativa de marcação, expressa em termos de % de área (figura 8). Como não observamos a marcação da proteína alvo na imagem usada para dispor as regiões de interesse, eliminamos o viés da escolha de áreas mais ou menos marcadas para a quantificação, além de evitarmos artefatos histológicos, como bordas de tecido e vasos sanguíneos. Estes dados foram transportados para uma planilha eletrônica e derivaram a média de área ocupada de determinada proteína em cada animal. Estas médias devidamente agrupadas foram comparadas estatisticamente pelo software Prism (GraphPad Inc., USA) com a aplicação do teste de Mann Whitney e Kruskal-Wallis.

Figura 7 – Imagens da técnica de imunofluorescência



Legenda: Imagens de um campo do núcleo supraquiasmático analisado de um animal do grupo ETOH testado entre 18:00 -19:30h. À esquerda a imagem dos núcleos marcados com DAPI, onde foi disposta uma área de interesse retangular. À direita a marcação de PER2 do respectivo campo com a proteína marcada em vermelho nos limites da área de interesse escolhida.

Figura 8 – Imagens da técnica de imunofluorescência



Legenda: Imagens de um campo do núcleo supraquiasmático analisado, de um animal do grupo ETOH testado entre 18:00 -19:30h. À esquerda a imagem dos núcleos marcados com DAPI. No centro, a marcação de PER2, e à direita, a imagem composta.

2.5 Avaliação do efeito da alteração da iluminação nos testes de campo aberto realizados durante o período escuro

Com base nos resultados comportamentais obtidos no grupo de animais testados durante o período escuro no horário entre 18:00 e 19:30h, optamos por realizar um experimento adicional investigando o efeito de testar os animais sob iluminação de lâmpada fluorescente (luz branca) durante o período escuro. Para tanto, uma amostra independente de camundongos foram expostos ao etanol (64 animais, provenientes de 9 ninhadas) ou salina (76 animais, provenientes de 10 ninhadas) de modo idêntico ao descrito no item 3.2. Em PN30, os animais de cada ninhada foram distribuídos em quatro grupos experimentais organizados de acordo com o horário de teste e a condição de iluminação:

- a) Grupo testado entre 14:00 e 15:30h sob luz branca;
- b) Grupo testado entre 14:00 e 15:30h sob luz vermelha;
- c) Grupo testado entre 18:00 e 19:30h sob luz branca;
- d) Grupo testado entre 18:00 e 19:30h sob luz vermelha.

Cumprir mencionar que nesta etapa, todos os testes foram realizados durante o período escuro do biotério, ou seja, os testes executados sob iluminação fluorescente branca representam uma quebra no ritmo circadiano destes animais.

Em todos os testes, a atividade locomotora foi registrada automaticamente conforme descrito no item 3.3.

2.6 Análise estatística

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

O teste exato de Fisher (2x2) foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos com relação às taxas de mortalidade. Análises de variância univariadas (uANOVA) foram utilizadas para avaliar os dados de peso em P30. Análises de variância de repetição (rANOVA) foram realizadas para avaliar os dados de peso durante o tratamento (de PN2 até PN8) e os dados comportamentais. O tratamento neonatal, o horário de teste e o gênero foram usados como fatores de classificação (*Between-Subjects Factors*) tanto para as uANOVAs quanto para as rANOVAs. A idade e os intervalos de tempo foram utilizados como fatores de repetição (*Within-Subjects Factors*). Para simplificar a apresentação dos resultados das rANOVAs, foram mostrados apenas os resultados dos testes univariados e, nos casos em que houve rejeição da hipótese de esfericidade, os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser (Huynh e Feldt, 1976). ANOVAs de menor ordem para cada horário foram utilizadas toda vez que foram detectados efeitos do horário ($P < 0,05$) ou interações envolvendo este fator ($P < 0,10$) nas ANOVAs (Snedecor GW. e Cochran WG., 1967). Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post hoc*.

3 RESULTADOS

3.1 Massa corpórea

A média de peso das ninhadas aumentou significativamente de PN2 a PN8 [Idade: F (1,74 / 55,72) = 340; P < 0,001]. Contudo, durante este período, os animais injetados com etanol apresentaram um ganho de peso menor do que os animais injetados com salina [Idade × Tratamento: F (1,7/55,7) = 8,0; P < 0,05]. Enquanto o aumento na massa corpórea dos animais do grupo ETOH foi de 110% e o dos animais do grupo SALINA foi de 140% (Tabela 1).

Tabela 1 - Massa corporal das ninhadas durante o período de exposição

	Peso médio das ninhadas (g)			
	PN2	PN4	PN6	PN8
SALINA	2,0 ± 0,0	2,8 ± 0,0	3,8 ± 0,0	4,8 ± 0,0
ETOH	2,0 ± 0,0	2,7 ± 0,0	3,5 ± 0,0	4,2 ± 0,0

Valores representam as médias ± EPM

Em PN30, não houve diferença de massa corpórea entre os animais dos grupos ETOH (21,3 ± 0,3 g) ou SALINA (20,6 ± 0,3 g) [Tratamento: F (1/69) = 0,001; P = 0,97]. Conforme o esperado, a massa corpórea média das fêmeas (19,8 ± 0,3 g) foi significativamente menor do que a dos machos (22,1 ± 0,3 g) [Sexo: F (1/69) = 8,5; P < 0,01]. Não houve interação entre Sexo e Tratamento para as medidas de massa corpórea em PN30.

3.2 Taxa de sobrevivência

A maioria dos animais dos grupos ETOH e SALINA sobreviveu até a conclusão dos testes comportamentais (tabela 2). Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre os animais que receberam injeções de salina ou etanol.

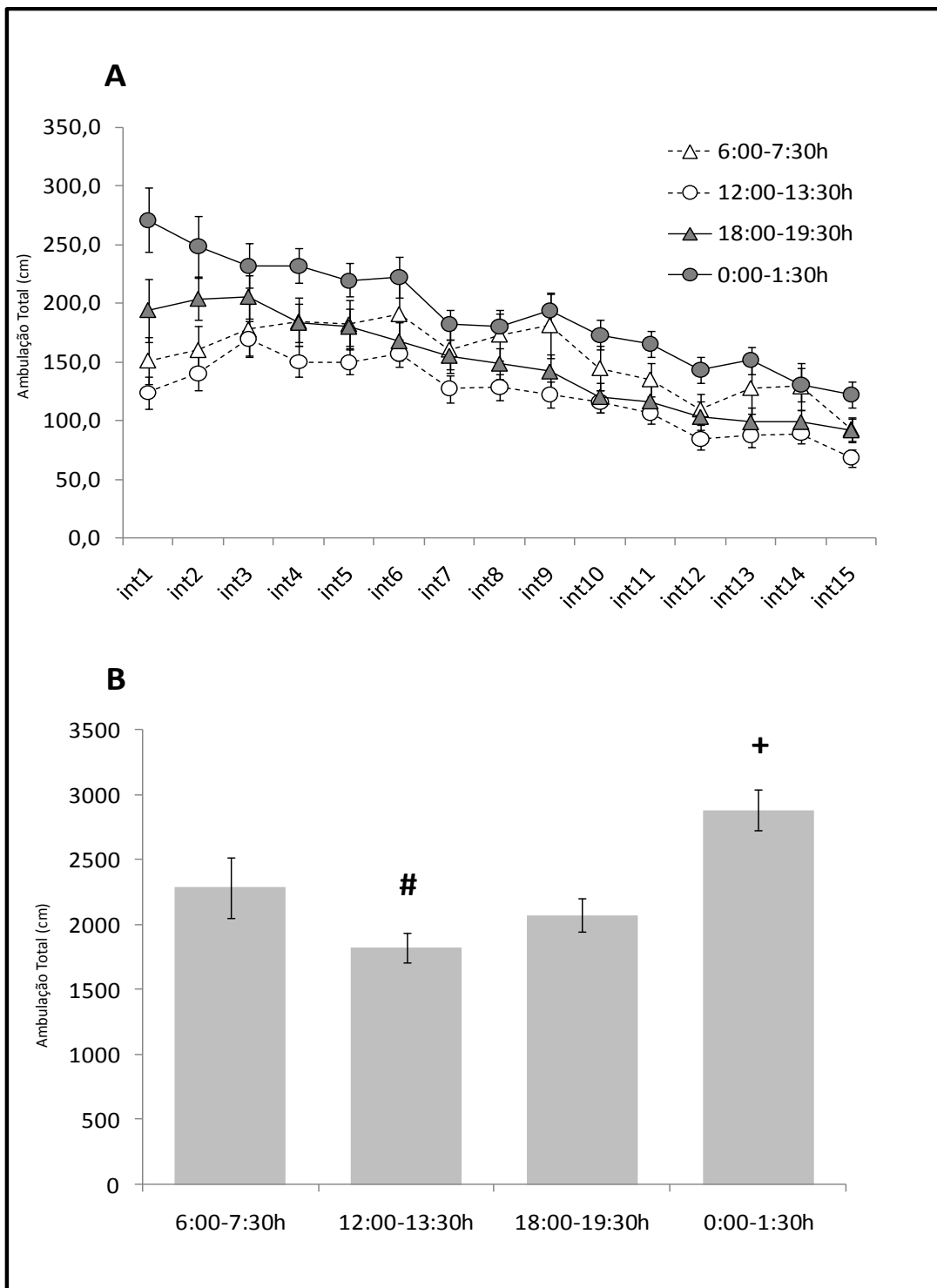
Tabela 2 - Taxa de sobrevivência dos animais expostos ao etanol ou salina

Grupo	Total de animais injetados em PN2	Total de animais mortos até PN30	Taxa de sobrevivência
SALINA	174	22	87,3%
ETOH	186	34	81,7%

3.3 Atividade locomotora

De modo geral, a atividade locomotora caiu de modo marcante a partir do sexto minuto de teste [Intervalo de tempo: $F(6,6/1050,2) = 37,8$; $P < 0,001$]. Do primeiro ao sexto minuto do teste, o comportamento dos animais variou em função do horário em que foram realizadas as sessões experimentais [Intervalo de tempo \times Horário: $F(19,8/1050,2) = 3,0$; $P < 0,001$] (Figura 9A). Ao longo dos seis primeiros intervalos de tempo, a atividade locomotora dos animais testados entre 6:00 e 7:30h não mudou significativamente, a dos animais testados entre 12:00 e 13:30h apresentou um leve aumento (27 %) e a dos animais testados entre 18:00 e 19:30h e entre 00:00 e 1:30h apresentou uma redução (respectivamente, 14% e 18%). Além disso, a atividade locomotora dos animais testados 00:00 e 1:30h foi maior que a dos animais testados entre 12:00 e 13:30h ao longo de todos os intervalos tempo. De fato, o grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h apresentou a maior atividade locomotora, o grupo dos animais testados entre 12:00 e 13:30h apresentou a menor e os grupos de animais testados entre 6:00 e 7:30h e entre 18:00 e 19:30h apresentou valores intermediários que não diferiram entre si [Horário: $F(3/159) = 6,5$; $P < 0,001$] (Figura 9B).

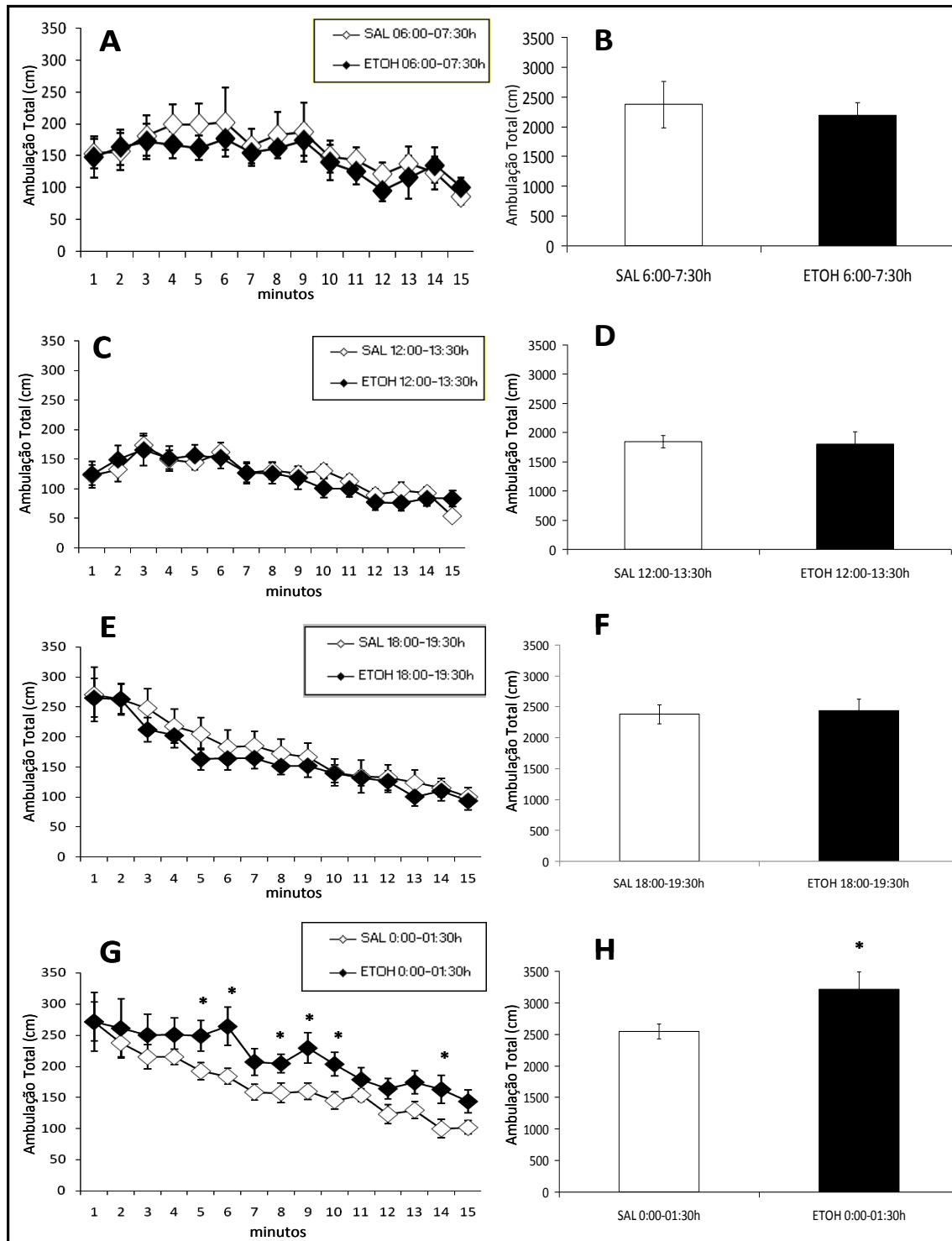
Gráfico 1 - Médias (+EPM) da ambulação em diferentes horários



Legenda: Médias (+EPM) da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto em diferentes horários do ciclo circadiano. Em A, estão representados os valores obtidos ao longo dos 15 intervalos de 1 minuto. Em B, estão representados os valores obtidos no tempo total de teste (15 minutos). Notar que o grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h apresentou a maior atividade locomotora (+) e o grupo dos animais testados entre 12:00 e 13:30h apresentou a menor (#). Teste FLSD: * P < 0,001.

De modo interessante, ANOVAs realizadas separadamente para cada horário indicaram que a exposição neonatal ao etanol promoveu hiperatividade locomotora apenas no grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h [Tratamento: $F(1/35) = 4,5$; $P < 0,05$] (Figura 10). Neste grupo, é possível notar que, ao longo dos seis primeiros intervalos de tempo, a atividade locomotora dos animais expostos à salina caiu significativamente e a dos animais expostos ao etanol se manteve constante (Figura 10G e H).

Gráfico 2 - Médias (+EPM) da ambulação dos animais ETOH ou SAL em diferentes horários



Legenda: Médias (+ erro padrão da média) da distância percorrida no teste de campo aberto dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou à salina (SAL) no período neonatal em diferentes horários: durante a fase clara entre 6:00 e 7:30h (A e B) e entre 12:00 e 13:30h (B e C) e durante a fase escura entre 18:00 e 19:30h (E e F) e entre 0:00 e 1:30h (G e H). Na coluna da direita (A,C,E e G), estão representados os valores obtidos ao longo dos 15 intervalos de 1 minuto. Na coluna da esquerda (B,D,F e H), estão representados os valores no tempo total de teste (15 minutos). Notar que os animais expostos ao etanol

apresentaram maior atividade locomotora que os animais expostos à salina (A) durante os testes realizados entre 0:00 e 1:30h (G e H). Teste FLSD: * $P < 0,05$.

3.4 Efeito da alteração da iluminação nos testes de campo aberto realizados durante o período escuro

A ausência de hiperatividade causada pelo etanol nos animais testados entre 18:00 e 19:30h contrasta com um estudo anterior realizado em nosso laboratório em que animais injetados com etanol e salina nas mesmas condições do presente estudo apresentaram hiperatividade locomotora (Nunes et al., 2011). Duas diferenças metodológicas entre estes estudos poderiam explicar esta discrepância nos resultados: 1) no primeiro estudo os animais foram testados na primeira metade da fase escura do ciclo claro/escuro (luz apagando as 13:00h e testes realizados entre 13:30 e 17:00h) e; 2). No primeiro estudo os animais foram testados com as luzes da sala de teste acesas. Desta forma, realizamos um experimento adicional para investigar os efeitos das condições de iluminação e do horário do durante o período escuro.

3.4.1 Massa corpórea e taxa de sobrevivência

A média de peso das ninhadas aumentou significativamente de PN2 a PN8 [Idade: $F(1,5 / 23,2) = 313,9$; $P < 0,001$] e conforme observado no estudo anterior, durante este período, os animais injetados com etanol apresentaram um ganho de peso menor do que os animais injetados com salina [Idade \times Tratamento: $F(1,5/23,2) = 5,0$; $P < 0,05$]. Enquanto o aumento na massa corpórea dos animais do grupo ETOH foi de 107%, o dos animais do grupo SALINA foi de 129 % (Tabela3).

Tabela 3 - Massa corporal das ninhadas durante o período de exposição

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

Valores representam as médias ± EPM

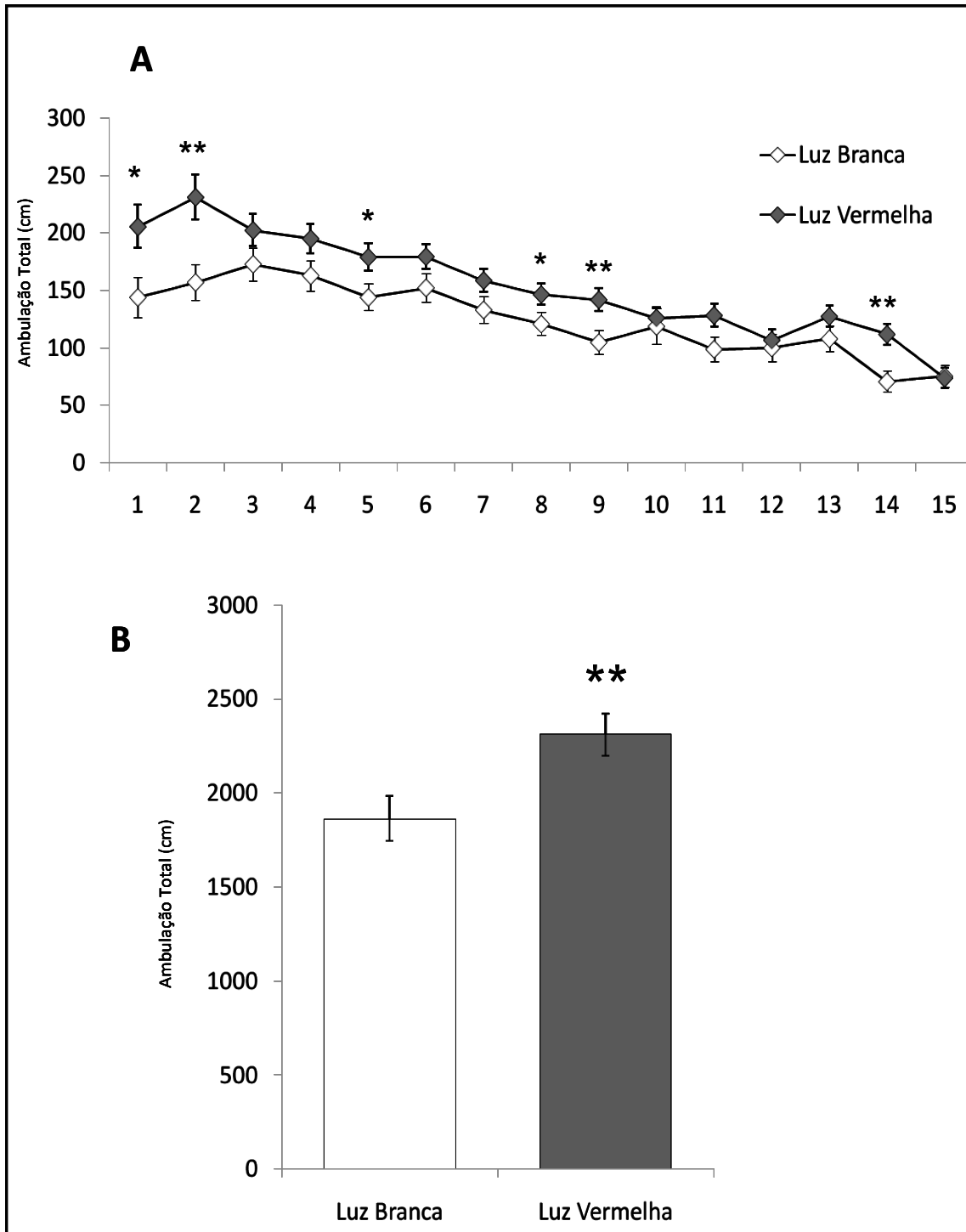
Em PN30, não houve diferença de massa corpórea entre os animais dos grupos ETOH ($21,8 \pm 0,8$ g) ou SALINA ($22,0 \pm 1,1$ g) [Tratamento: $F(1/37) = 0,03$; $P = 0,86$]. Embora os valores de massa corpórea das fêmeas ($20,9 \pm 1,0$ g) tenham sido menores que o dos machos ($22,9 \pm 1,0$ g), esta diferença não alcançou significância estatística [Sexo: $F(1/37) = 2,3$; $P = 0,14$]. Não houve interação entre Sexo e Tratamento para as medidas de massa corpórea em PN30.

A maioria dos animais dos grupos ETOH e SALINA sobreviveu até a conclusão dos testes comportamentais (ETOH = 84%; SALINA = 97%). Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre os animais que receberam injeções de salina ou etanol.

3.4.2 Atividade locomotora

De modo semelhante ao estudo anterior, a atividade locomotora caiu de modo marcante a partir do sexto minuto de teste [Intervalo de tempo: $F(7,6/699,7) = 25,1$; $P < 0,001$]. Do segundo ao sexto minuto do teste, o comportamento dos animais variou em função da condição de iluminação na qual os testes foram realizados [Intervalo de tempo × Iluminação: $F(7,7/699,7) = 2,3$; $P < 0,05$] (Figura 11A). Neste período, a atividade locomotora dos animais testados sob a iluminação com luz branca não mudou significativamente e a dos animais testados sob a iluminação com luz vermelha apresentou uma significativa redução (22 %). Apesar disso, ao longo do teste, a atividade dos animais testados sob a iluminação com luz vermelha foi maior que a dos animais testados a iluminação com luz branca [Iluminação: $F(1/91) = 7,8$; $P < 0,01$] (Figura 11B).

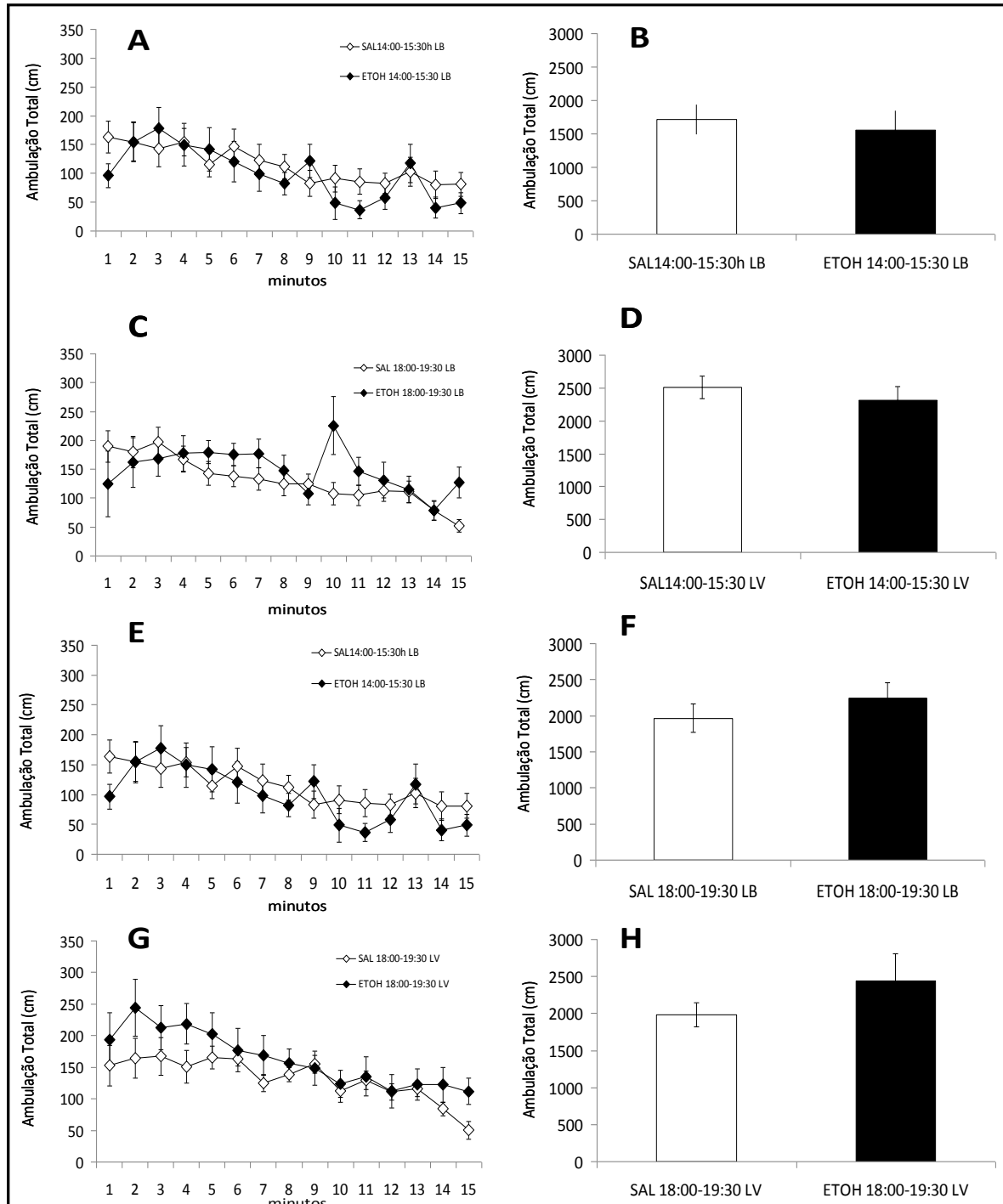
Gráfico 3 - Médias (+EPM) da ambulação sob luz branca ou luz vermelha



Legenda: Médias (erro padrão da média) da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto realizados durante a fase escura sob iluminação de luz branca ou luz vermelha. Em A, estão representados os valores obtidos ao longo dos 15 intervalos de 1 minuto. Em B, estão representados os valores obtidos no tempo total de teste (15 minutos). Notar que a atividade nos testes realizados sob iluminação de luz vermelha é a maior que a realizada sob iluminação com luz branca.

Não foram observadas diferenças entre os animais expostos ao etanol ou salina em nenhuma das condições avaliadas neste experimento (Gráfico 4).

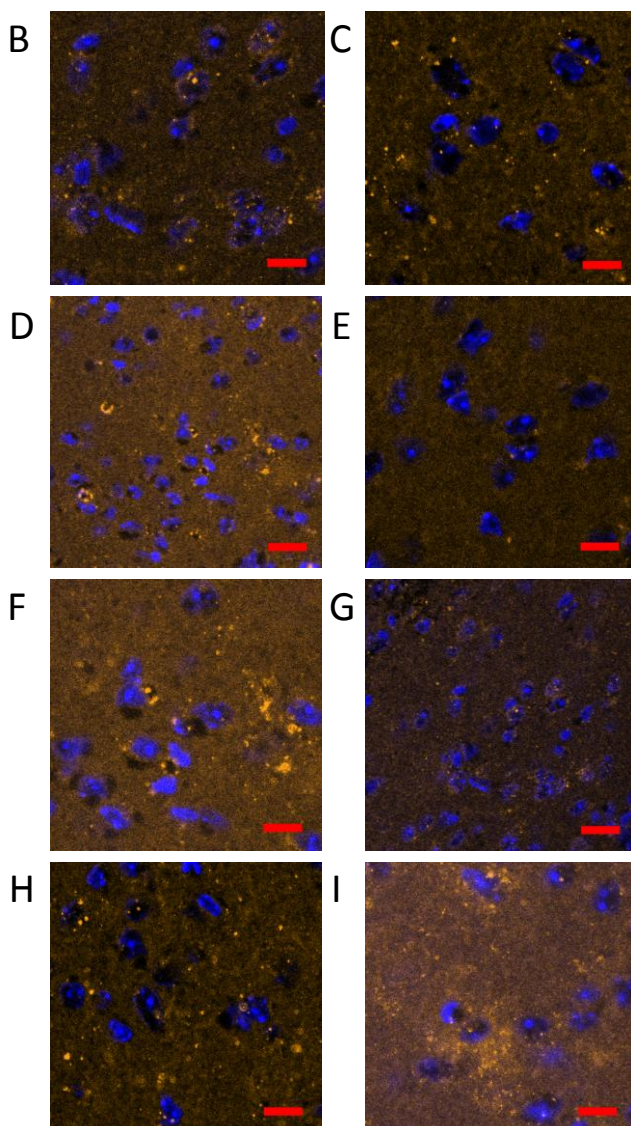
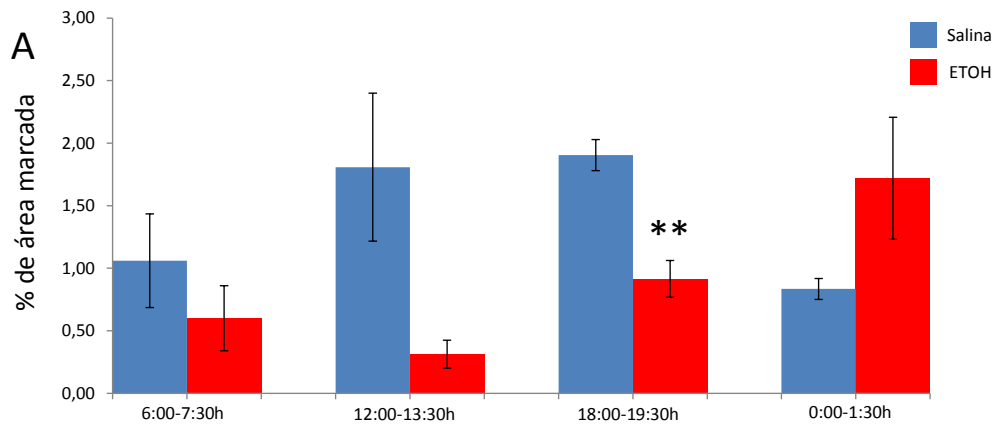
Gráfico 4 - Médias (+EPM) da ambulação dos animais expostos ao ETOH ou SAL sob luz branca ou vermelha



Legenda: Médias (+erro padrão da média) da distância percorrida no teste de campo aberto dos animais expostos ao etanol (ETOH) ou à salina (SAL) no período neonatal durante o ciclo escuro entre 14:00 e 15:30h (A-D) e entre 18:00 e 19:30h (E-H) e sob diferentes condições de iluminação: LB (luz branca) e LV (luz vermelha). Na coluna da direita (A,C,E e G), valores obtidos ao longo dos 15 intervalos de 1 minuto do teste. Na coluna da esquerda (B,D,F e H), valores no tempo total de teste (15 minutos).

3.5 Análise da expressão dos genes de controle do ritmo circadiano

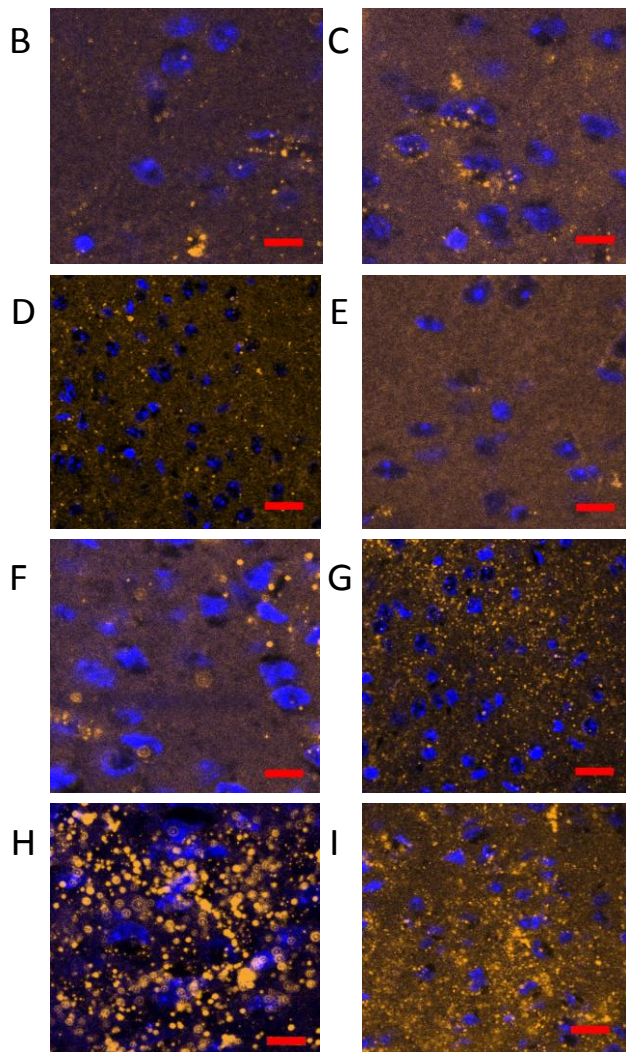
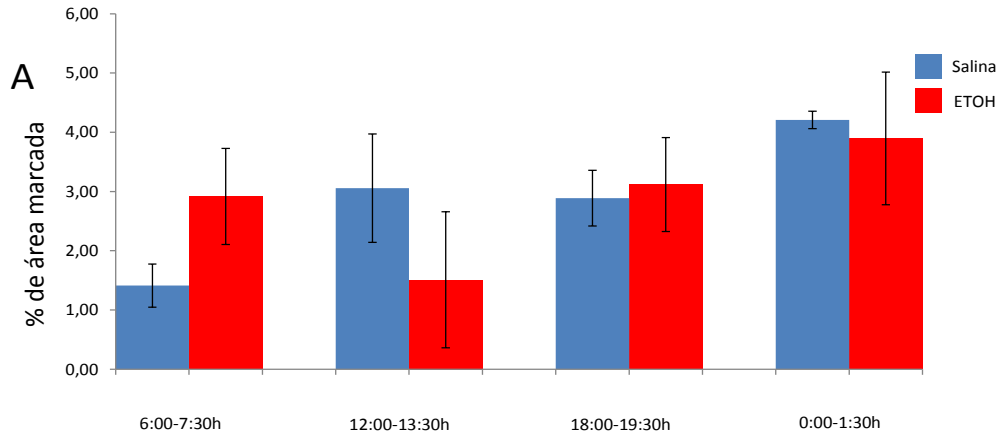
Em relação à expressão dos genes Per 1 (Figura9), as ANOVAs realizadas separadamente para cada horário indicaram que a imunomarcagem do grupo ETOH foi significativamente menor que a do grupo SALINA para os animais testados entre 18:00 e 19:30h [Tratamento: $F(1/6) = 23,9$; $P < 0,01$] e tendeu a significância estatística para os animais testados entre 12:00 e 13:30h [Tratamento: $F(1/11) = 4,4$; $P = 0,06$]. Não foram observadas diferenças significativas para os animais testados entre 6:00 e 7:30h e entre 0:00 e 1:30h.



Legenda: Em A, médias (\pm erro padrão da média) das medidas do percentual de área marcada dos campos de imunofluorescência do núcleo supraquiasmático para o gene PER 1 nos diferentes horários. Em B - I, fotomicrografias das áreas representativas do núcleo supraquiasmático obtidos em microscopia confocal, marcados com PER 1 em cor laranja e DAPI em azul. Na coluna da esquerda temos as imagens do grupo SALINA e na da direita, as do ETOH. Na primeira linha temos as imagens dos animais testados entre 6:00-7:30h, na segunda linha, entre 12:00-13:30h, na terceira linha, entre 18:00-19:30h e na quarta linha, entre 0:00-1:30h.

Em relação à expressão dos genes Per 2 (Figura 10), as ANOVAs realizadas separadamente para cada horário não indicaram nenhuma diferença entre os animais dos grupos ETOH e SALINA.

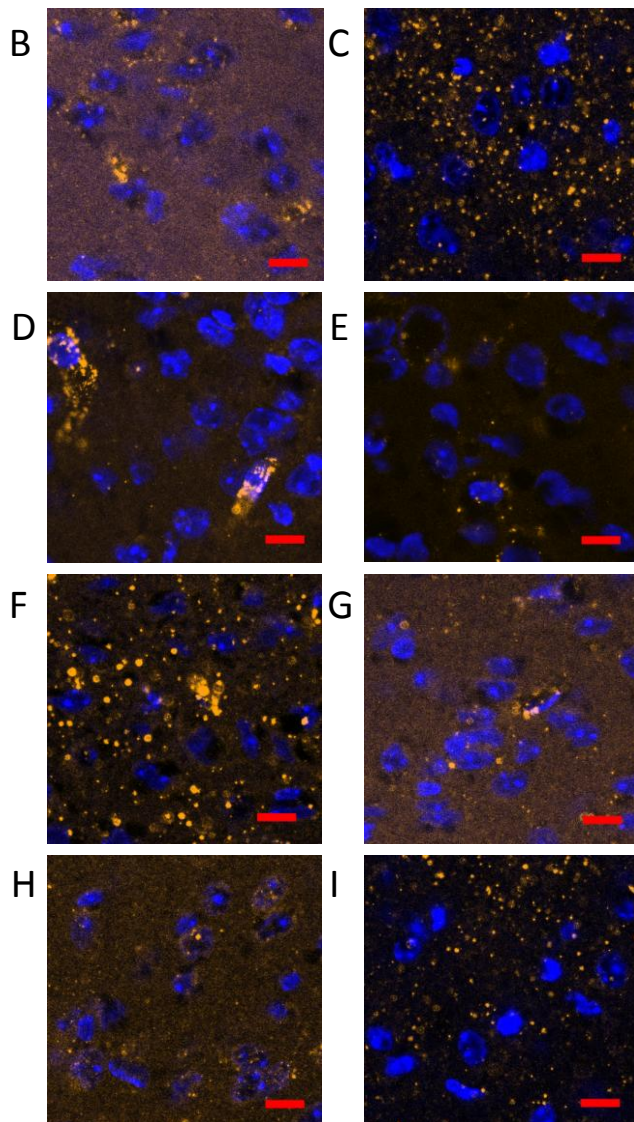
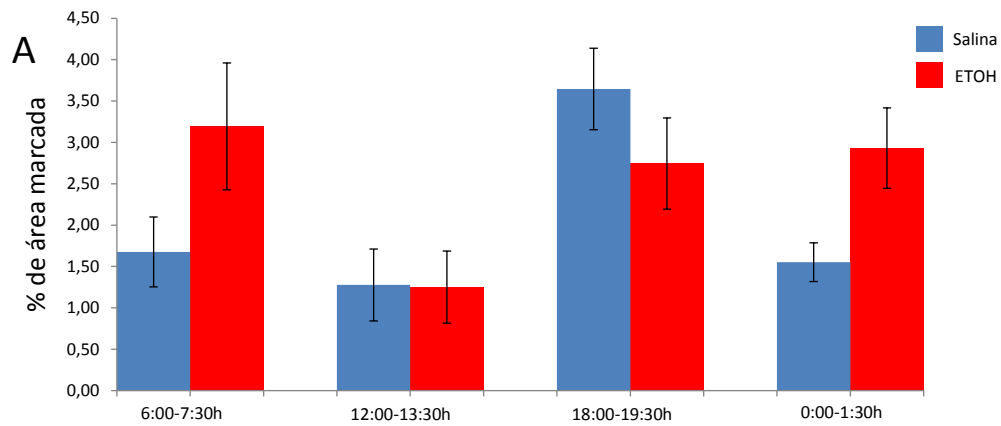
Figura 10 - Médias (\pm EPM) do percentual de área marcada para o gene PER 2



Legenda: Em A, médias (\pm erro padrão da média) das medidas do percentual de área marcada dos campos de imunofluorescência do núcleo supraquiasmático para o gene PER 2 nos diferentes horários. Em B - I, fotomicrografias das áreas representativas do núcleo supraquiasmático obtidos em microscopia confocal, marcados com PER 2 em cor laranja e DAPI em azul. Na coluna da esquerda temos as imagens do grupo SALINA e na da direita, as do ETOH. Na primeira linha temos as imagens dos animais testados entre 6:00-7:30h, na segunda linha, entre 12:00-13:30h, na terceira linha, entre 18:00-19:30h e na quarta linha, entre 0:00-1:30h.

Em relação à expressão dos genes Per 3, a imunomarcação variou em função do horário [Horário: $F(3/34) = 5,0$; $P < 0,01$]. Particularmente, os valores apresentados pelos animais testados entre 12:00 e 13:30h ($1,3 \pm 0,3$) foram significativamente menores que a dos animais testados no período escuro entre 18:00 e 19:30h ($3,1 \pm 0,4$) e entre 0:00e 1:30h ($2,5 \pm 0,4$). Além disso, os valores apresentados pelos animais testados entre 18:00 e 19:30h ($3,1 \pm 0,4$) foram significativamente maiores que a dos animais testados no período claro entre 6:00 e 7:30h ($1,9 \pm 0,4$) e entre 0:00 e 1:30h ($2,5 \pm 0,4$). As ANOVAs realizadas separadamente para cada horário não revelaram diferenças significativas entre os grupos ETOH e SALINA para a expressão do gene Per3 (Figura 11).

Figura 11 - Médias (+EPM) do percentual de área marcada para o gene PER 3



Legenda: Em A, médias (\pm erro padrão da média) das medidas do percentual de área marcada dos campos de imunofluorescência do núcleo supraquiasmático para o gene PER 3 nos diferentes horários. Em B - I, fotomicrografias das áreas representativas do núcleo supraquiasmático obtidos em microscopia confocal, marcados com PER 3 em cor laranja e DAPI em azul. Na coluna da esquerda temos as imagens do grupo SALINA e na da direita, as do ETOH. Na primeira linha temos as imagens dos animais testados entre 6:00-7:30h, na segunda linha, entre 12:00-13:30h, na terceira linha, entre 18:00-19:30h e na quarta linha, entre 0:00-1:30h.

4 DISCUSSÃO

4.1 Resumo dos resultados

Considerando que os distúrbios neurocomportamentais causados pelo consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação como a hiperatividade locomotora podem estar associados com alterações no sistema de controle do ritmo circadiano, neste estudo avaliamos, em camundongos, os efeitos da exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral na atividade locomotora e na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano em diferentes momentos do ciclo claro/escuro. Além disso, investigamos se a condição de iluminação (luz branca x luz vermelha) afeta a atividade locomotora dos animais expostos ao etanol ou à salina nos testes realizados durante o período noturno (14:00 - 15:30 ou 18:00 - 19:30h).

Os animais injetados com etanol apresentaram um ganho de peso menor do que os animais injetados com salina durante o período de exposição. Contudo, em PN30, essa diferença de pesos nos grupos já não foi mais encontrada. Apesar do caráter invasivo das injeções intraperitoneais, a maioria dos animais dos grupos ETOH e SALINA sobreviveu até a conclusão dos testes comportamentais.

De modo geral, a atividade locomotora caiu consideravelmente a partir do sexto minuto de teste. Entretanto, no início das sessões experimentais o comportamento dos animais foi afetado de modo marcante pelo horário e pela condição de iluminação do experimento. Ao longo dos seis primeiros minutos, a atividade locomotora dos animais testados durante o período claro ou durante o período escuro sob a iluminação com luz branca não mudou significativamente ou apresentou um leve aumento e a dos animais testados no período escuro sob iluminação com luz vermelha apresentou uma marcante redução. Além disso, o grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h apresentou a maior atividade locomotora e o grupo dos animais testados entre 12:00 e 13:30h apresentou a menor ambulação. Para os animais testados no período escuro entre 18:00 e 19:30h, a atividade locomotora foi menor sob a iluminação com luz branca do que sob a iluminação com luz vermelha.

De modo importante, exposição neonatal ao etanol promoveu hiperatividade locomotora apenas no grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h.

Em relação aos genes de controle do ritmo circadiano, exposição neonatal ao etanol afetou apenas a expressão do gene *Per1*. Em comparação com os animais do grupo SALINA, a expressão do grupo ETOH foi menor entre 18:00 e 19:30h e tendeu a significância estatística entre 12:00 e 13:30h. A imunomarcação do gene *Per3* variou em função do horário sendo mais alta 18:00 e 19:30h e mais baixa entre 12:00 e 13:30h.

4.2 Via de administração do etanol

A metodologia utilizada em uma pesquisa é dependente de diversos fatores como, os objetivos do trabalho, o laboratório em que se desenvolve, etc, dessa maneira, Diversas técnicas de administração de etanol em roedores neonatos podem ser utilizadas, por exemplo, o modelo de criação artificial (pup in the cup model), a administração por via oral (gavagem ou administração da solução de etanol nas garrafas de água das gaiolas) e as câmaras de inalação de vapor de etanol (Diaz e Samson, 1980; Filgueiras et al., 2009; Kelly e Lawrence, 2008; Nunes et al., 2011; Pal e Alkana, 1997). Apesar da consistência dos resultados obtidos com estas técnicas, cada uma delas apresenta desvantagens e limitações, afinal, outros fatores inerentes às técnicas, além da toxicidade do etanol, podem afetar os resultados neurocomportamentais. Por exemplo, no modelo de criação artificial uma cânula é inserida cirurgicamente no estômago dos filhotes que ficam isolados da mãe e dos demais filhotes e nos modelos que envolvem a administração do etanol via gavagem os filhotes são submetidos à frequente estresse por manipulação e separação da progenitora e a própria inserção do tubo de gavagem pode lesionar o trato digestivo e afetar o comportamento de mamar. O procedimento empregado em nossos estudos foi o de injeções intraperitoneais, esta via de administração foi utilizada em estudos prévios do nosso grupo (Diaz e Samson, 1980; Filgueiras et al., 2009; Filgueiras et al., 2010) e por outros autores (Forbes et al., 2013; Legastelois et al., 2013). 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. Apesar do risco de lesão dos órgãos da cavidade abdominal, a maioria dos animais sobreviveu até o trigésimo dia pós-natal.

4.3 Ganho de peso e taxa de sobrevivência

Em um estudo toxicológico, a medida de ganho de massa corpórea dos animais no decorrer do tratamento é de grande importância (Henck, 2002). O crescimento corpóreo pode ser um indicador sensível do estado de saúde geral e a avaliação periódica do peso pode sugerir se os animais estão com a saúde comprometida ou se estão se recuperando de um insulto (Henck, 2002). Além disso, o conhecimento sobre a massa corpórea no momento do teste comportamental é importante para a interpretação dos dados uma vez que alterações no tamanho dos animais podem confundir os resultados comportamentais (Henck, 2002).

Durante o período de exposição, nossos dados mostraram que os animais do grupo ETOH tiveram um ganho de massa inferior ao grupo SALINA, sugerindo que a exposição ao etanol compromete o desenvolvimento dos animais. Dado este que está em acordo com resultados já encontrados em ratos submetidos, em dias alternados, a injeções intraperitoneais de etanol (5mg/kg) de PN4 a PN10 (Filgueiras et al., 2010). Além disso, nossos dados também estão de acordo com estudos em humanos que mostraram que o consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação é capaz de promover um retardo no crescimento corpóreo durante a infância (Jones KL. et al., 1973; Jones KL. e Smith DW., 1973). O retardo no crescimento decorrente da exposição gestacional ao álcool tem sido associado com a redução dos níveis de hormônio do crescimento (Blaine et al., 1999; Conway e Garbouzova, 1996), que é um fator promotor do crescimento durante desenvolvimento gestacional (Anderson e Scanes, 2012). Contudo, outros fatores podem contribuir para o retardo do crescimento causado pela exposição precoce ao etanol, como por exemplo, a diminuição da ingestão de leite decorrente da sedação, da redução dos movimentos reflexos da mandíbula responsáveis pela sucção do leite (Kogo et al., 1996; Turman, Jr. et al., 1999) ou da diminuição do apetite (Werts et al., 2013). Um estudo recente demonstrou que a maioria das crianças cujas mães ingeriram álcool durante a gravidez apresentavam obesidade ou baixo peso e 31,6% dessas crianças reclamavam de falta de apetite, enquanto 57% apresentaram um consumo excessivo de açúcar (Werts et al., 2013).

Em contraste com nossos resultados, alguns estudos realizados em camundongos, inclusive por nosso grupo, não encontraram diferenças no ganho de peso durante o período de exposição. Em camundongos expostos ao vapor de etanol (com nível de álcool em sangue variando de 160 a 290mg/dL) de PN2 a PN14 não foram observadas diferenças de peso em relação aos seus controles durante o período de tratamento (Pal e Alkana, 1997). A exposição

ao etanol por via intraperitoneal em dias alternados de PN2 até PN8 também não afetou o ganho de peso dos camundongos (Filgueiras et al., 2009; Nunes et al., 2011) mesmo quando estes foram comparados com animais não injetados (Filgueiras et al., 2009). Vale mencionar que nos estudos prévios realizados por nosso grupo (Filgueiras et al., 2009; Nunes et al., 2011), a dose de etanol, o período de exposição e a quantidade de injeções foram os mesmos que os do presente estudo. Contudo, enquanto no presente estudo a maioria das ninhadas apresentou entre 8 a 12 animais, nos demais trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório a maioria das ninhadas apresentaram mais de 12 animais. Este fato é particularmente importante, pois, um estudo atualmente em andamento em nosso laboratório demonstra que o efeito do etanol no ganho de massa dos animais depende do número de filhotes da ninhada no momento das injeções. Ou seja, quanto menor é o número de filhotes em uma ninhada, mais evidente é o retardo no crescimento causado pelo etanol.

No dia do teste, a massa corporal dos animais tratados com etanol ou com salina não diferiu. Este resultado sugere que, apesar do retardo no crescimento durante o período neonatal, os animais conseguem recuperar a massa corporal no início da adolescência. Vale mencionar que a ausência de diferenças na massa corporal na adolescência não descarta a possibilidade de que mais tardiamente os animais expostos ao etanol apresentem alterações na massa corpórea. Em acordo com esta ideia está o fenômeno de programação metabólica no qual roedores submetidos à desnutrição durante o período de lactação desenvolvem obesidade na vida adulta (de Moura E.G., et al., 2008).

4.4 Efeito do intervalo

Para todos os grupos formados, independente do tratamento neonatal, do horário e da condição de iluminação, foi observado um declínio na atividade locomotora a partir do 6^o minuto de teste. Em estudos de comportamento rotacional de nado livre, por exemplo, já foi descrito que a atividade natatória diminui do primeiro para o último intervalo de tempo (Krahe et al., 2001; Schmidt et al., 1999). Em relação ao teste de campo aberto, outros trabalhos também demonstraram que no decorrer do experimento a atividade locomotora apresenta uma atenuação. Em um estudo que avaliou a expressão de acetilcolina e a atividade locomotora, tanto os camundongos com expressão exacerbada quanto os controles tiveram

uma redução na taxa de ambulação no campo aberto ao longo dos 120 minutos de teste, sendo que nos primeiros vinte minutos a queda foi bastante acentuada (Nagy e Aubert, 2013).

Nosso resultado foi obtido em 15 minutos de teste, sugerindo que a queda na média de locomoção não se deve somente à uma provável fadiga dos animais e, portanto, há um outro fator associado. Em estudos de comportamento é comum o uso do termo habituação, que diz respeito a uma aprendizagem não-associativa que é caracterizada por uma redução progressiva na intensidade de uma resposta a um estímulo constante ou repetitivo. Sendo assim, no início do teste quando ainda há o elemento de novidade, grande parte da atividade dos animais está associada com a exploração do ambiente, por hora desconhecido, entretanto, após alguns minutos na medida em que o meio se torna familiar, o fator novidade passa a não contribuir mais com a locomoção dos animais (Kenzer et al., 2013; Leussis e Bolivar, 2006). Essa habituação dentro de uma mesma sessão de teste é denominada intra-sessão, já quando ela ocorre entre uma sessão e outra o termo utilizado é habituação inter-sessões (Ribeiro-Carvalho et al., 2010; Thiel et al., 1999). Tem sido proposto que a habituação intra-sessão mede a capacidade de o animal aprender sobre o ambiente de teste, ao passo que a habituação inter-sessão reflete a memória do que foi aprendido na sessão anterior (Leussis e Bolivar, 2006). Desta forma, quanto mais simples é um ambiente e/ou maior é a capacidade do animal explorar e aprender sobre o ambiente de teste, mais rápida será a habituação.

4.5 Efeito do horário e da iluminação no comportamento ao longo do teste

São muitos os fatores que levaram determinadas espécies a desenvolverem hábitos noturnos. Roedores, em geral, apresentam uma preferência em se alimentar e se locomover durante o período escuro e, por isso, possuem mecanismos específicos que permitem sua adaptação a essas condições. Sendo assim, estudos que comparam a proporção de certas atividades desses animais com os horários em que são realizadas, frequentemente, demonstram que os comportamentos adotados pelo animal variam em função do horário do dia. Uma série de estudos demonstraram que a atividade locomotora de ratos e camundongos medida em rodas de atividade (*running wheels*) é maior durante toda a fase escura do ciclo circadiano (Allen et al., 2005a; Klejbor et al., 2013; Rosenthal et al., 2005; Sakata-Haga et al., 2006). De modo geral, assim que as luzes apagam os animais começam a se locomover nas rodas de atividade e utilizam as rodas diversas vezes durante a maior parte do tempo da fase

escura. Durante a fase claro são raros os momentos em que os animais utilizam as rodas de atividade. Com base nos resultados obtidos com a roda de atividade, seria esperado que, no presente estudo, a atividade locomotora nos testes realizados na fase escura (18:00-19:30h e 00:00-1:30) fossem superiores a dos testes realizados na fase clara (6:00-7:30h e 12:00-13:30). Contudo, em nosso estudo diferenças foram observadas apenas entre os animais testados no final das fases clara e escura. Particularmente, o grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h apresentou a maior atividade locomotora, o grupo dos animais testados entre 12:00 e 13:30h apresentou a menor e os grupos de animais testados entre 6:00 e 7:30h e entre 18:00 e 19:30h apresentou valores intermediários que não diferiram entre si. Esta discrepância pode estar associada à algumas diferenças entre os testes de campo aberto e os teste realizados com as rodas de atividade.

Geralmente as rodas de atividade são adaptadas nas gaiolas em que os animais são criados e mantidos e a atividade locomotora é registrada 24 horas por dia durante vários dias consecutivos. Além disso, neste modelo, o animal fica livre para iniciar e interromper a atividade na roda quantas vezes quiser. Por esta razão, as rodas de atividade são consideradas um paradigma para avaliar a atividade locomotora geral dos animais (Careau et al., 2012). Alguns etologistas especulam que a atividade na roda reflete aspectos das distâncias percorridas naturalmente pelos animais diariamente nas gaiolas (Swallow et al. 2009; Feder et al. 2010). Por outro lado, no teste de campo aberto os animais são colocados em um ambiente totalmente novo e a atividade locomotora é medida por um tempo bem menor (entre 5 minutos e 2 horas). De fato, o teste de campo aberto vem sendo utilizado em roedores principalmente para avaliar o comportamento exploratório e a reatividade emocional (Choleris et al., 2001; Prut e Belzung, 2003). De modo geral, o teste de campo aberto é muito simples e consiste simplesmente em colocar o animal em uma arena da qual não há como escapar devido às paredes circundantes. No campo aberto, é possível extrair reações de defesa do animal, visto que este novo ambiente pode ser potencialmente perigoso à sua sobrevivência (Choleris et al., 2001). Em tal situação, roedores espontaneamente preferem a periferia do aparato à parte central da arena (Choleris et al., 2001; Prut e Belzung, 2003). O tempo gasto na parte central, a razão entre a ambulação no centro e total ou a latência para entrar na parte central da arena são normalmente utilizados como indicadores de ansiedade (Prut e Belzung, 2003). Generalizando, um aumento destas medidas pode ser interpretado como um efeito ansiolítico, enquanto que o contrário, isto é, a diminuição destas variáveis, como um efeito ansiogênico (Choleris et al., 2001; Prut e Belzung, 2003).

De forma interessante, no presente estudo o horário do teste afetou o comportamento dos animais no início das sessões experimentais. Particularmente, ao longo dos seis primeiros minutos, a atividade locomotora dos animais testados durante o período claro não mudou significativamente (entre 6:00-7:30h) ou apresentou um leve aumento (entre 12:00 e 13:30h) enquanto que nos animais testados nos dois horários do período escuro apresentou uma marcante redução. Considerando a natureza exploratória da atividade locomotora nos testes de campo aberto, a diferença início dos testes pode estar associada ao fato de que durante a fase clara os animais podem utilizar a visão para explorar o ambiente. Utilizando a visão os animais poderiam cobrir uma grande extensão da área de teste com poucos movimentos de cabeça necessitando, portanto, de pouca ambulação. Em contraste, nos testes realizados durante a fase escura, os animais não podem contar com a visão para explorar o ambiente e tem que contar com o sistema de vibrissas de modo mais pronunciado. Considerando a pequena área coberta pelas vibrissas (comparada à visão), as maiores distâncias percorridas pelo animal no início dos testes realizados na fase escura podem ser uma consequência do fato de que as animais precisam deambular para obter informações táteis do ambiente com as vibrissas (tigmotaxia). Na medida em que os animais aprendem sobre o ambiente este comportamento diminui e a atividade locomotora se reduz.

Um fato interessante é que nos experimentos realizados para avaliar a condição de iluminação, o comportamento dos animais testados na fase escura sob a iluminação com luz branca foi idêntico ao comportamento dos animais testados durante a fase clara. Particularmente, a atividade locomotora foi menor e praticamente não caiu ao longo dos primeiros seis minutos. Este fato sugere que, pelo menos para o tipo de recipiente utilizado em nosso estudo o fato do animal poder utilizar a visão foi mais importante do que propriamente o horário em que foram realizadas as sessões.

4.6 Exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral promove marcante hiperatividade

A hiperatividade gerada pela exposição precoce ao etanol é tema de diversos estudos e, atualmente, além de comprovada se encontra bem difundida. Trabalhos realizados por nosso grupo, inclusive, demonstraram que a administração de etanol durante os 10 primeiros dias pós-natais causa hiperatividade locomotora em camundongos pré-púberes (Nunes et al., 2011). Esse assunto é vasto e recorrente na literatura, sendo possível encontrar estudos da década de 1980 até os dias atuais, Kelly et al., 1987; Melcer et al., 1994; Riley et al., 1993; Slawewski et al., 2004; Thomas et al., 2001; Thomas et al., 2007, mostrando de modo consistente que este período é crítico para a manifestação da hiperatividade locomotora em roedores.

É importante notar que os 10 primeiros dias de vida pós-natal em ratos e camundongos correspondem à fase de aumento exponencial do período de surto de crescimento cerebral (Dobbing e Sands, 1979). Durante este período, ocorrem os picos de uma série de processos fundamentais para a formação da circuitaria neural como a migração de populações neuronais, o crescimento axonal e dendrítico e a sinaptogênese em diversas regiões cerebrais (Goodlett CR. et al., 2005; Goodlett e Horn, 2001). Além disso, neste período os circuitos já formados são refinados pela retração dos terminais e pela morte celular por apoptose (Olney et al., 2000). Desta forma, qualquer perturbação durante este período pode comprometer de modo significativo à formação das futuras redes neurais e, portanto, acarretar em prejuízos geralmente irreversíveis para a vida do indivíduo. Uma série de estudos tem mostrado que a exposição ao etanol durante este período é capaz de interferir com a proliferação celular, a adesão entre células, a morte celular programada, a migração neuronal, o crescimento axonal e a sinaptogênese (Goodlett CR. et al., 2005; Goodlett e Horn, 2001).

Alguns autores têm sugerido que a neuroapoptose causada pelo etanol desempenha um papel determinante na fisiopatologia da hiperatividade locomotora e de outras desordens neurocomportamentais causadas pela exposição precoce ao etanol (Han et al., 2005; Ieraci e Herrera, 2006; Medina, 2011; Wozniak et al., 2004). Esta ideia é consistente com os estudos que mostram que crianças com TDAH apresentam redução significativa na espessura cortical e menores volumes no córtex pré-frontal, núcleo estriado e córtex cingulado anterior e que quanto menores os volumes mais severos são os sintomas do TDAH (Dopheide e Pliszka, 2009; Krain e Castellanos, 2006). Embora a etiologia do TDAH não seja completamente

conhecida, é bem aceita a ideia que uma disfunção do córtex pré-frontal e/ou suas conexões com o córtex cingulado anterior, núcleos da base e cerebelo subjazem os distúrbios neurocomportamentais dos indivíduos com TDAH (Arnsten, 2011; Durston et al., 2011; Liston et al., 2011). Particularmente, a hiperatividade locomotora tem sido associada a uma hipofunção dos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos do núcleo estriado que projetam para o córtex pré-frontal (Sagvolden et al., 2005). Vale mencionar que as projeções catecolaminérgicas provenientes dos estriado atuam em interneurônios no córtex pré-frontal exercendo forte influência modulatória (Sagvolden et al., 2005).

Além da redução do número de neurônios, a exposição ao etanol no período de surto de crescimento cerebral é capaz de promover outras ações que podem perturbar a sequência normal do desenvolvimento e levar aos distúrbios funcionais nos circuitos corticoestriatais observados nos indivíduos com TDAH (Arnsten, 2011; Durston et al., 2011; Liston et al., 2011). Um número crescente de evidências sugere que a exposição gestacional ao etanol durante o terceiro trimestre, promove uma diminuição das funções celulares mediadas pelos segundos-mensageiros AMPc e GMPc (Filgueiras et al., 2010; Lantz et al., 2012; Medina, 2011; Nunes et al., 2011; Paul et al., 2010). Estudos em roedores têm sugerido que prejuízos nas vias de sinalização mediadas pelo AMPc e o GMPc contribuem para a hiperatividade locomotora observada em animais que estão em um estado hipocatecolaminérgico (Paine et al., 2009; Pascoli et al., 2005; Russell, 2003). Nestas vias o aumento das concentrações intracelulares de AMPc e GMPc causados pela ativação dos receptores dopaminérgicos ou adrenérgicos levam a ativação de proteínas cinases dependentes de nucleotídeo PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) e PKG (*cGMP-dependent protein kinase*) (Medina, 2011). Tanto a PKA como a PKG fosforilam fatores de transcrição como o CREB (*cAMP response element binding protein*) e o SRF (*serum response factor*) levando a expressão de uma série de genes que modulam a excitabilidade neuronal e a plasticidade (Goto e Grace, 2007; Gurden et al., 1999; Gurden et al., 2000). A administração de vimpocetina, um inibidor da fosfodiesterase do tipo 1 (PDE1, enzima que converte o AMPc em AMP e o GMPc em GMPc), restaura os níveis de AMPc e GMPc e é capaz de mitigar a hiperatividade de animais expostos ao etanol durante o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana (Nunes et al., 2011).

4.7 Apenas o grupo de animais testado no final da fase escura apresentou hiperatividade causada pelo etanol

A ausência de diferenças na atividade locomotora entre os animais dos grupos ETOH e SALINA testados nos demais horários da fase escura é, de certa forma, surpreendente uma vez que a hiperatividade causada pela exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral tem sido demonstrada em roedores durante o período noturno independentemente do fato de os animais terem sido testados sob iluminação com luz vermelha (Melcer et al., 1994; Riley et al., 1993), luz branca (Slawewski et al., 2004) ou com as luzes apagadas (Thomas et al., 2001). Esta discrepância sugere que outros fatores, além do horário ou da condição de iluminação, podem ter interferido com os nossos resultados. De fato, não encontramos hiperatividade locomotora causada pelo etanol mesmo quando variamos a condição de iluminação (luz branca × luz vermelha) e o horário do teste durante a fase escura (testes entre 14:00 e 15:30h × testes entre 18:00 e 19:30h).

Um aspecto importante na utilização do teste de campo aberto como modelo para avaliar a hiperatividade locomotora é que o grau de novidade da situação experimental ao qual o animal é submetido pode influenciar os resultados (Russell, 2011). De modo geral é bem aceita a ideia de que a hiperatividade locomotora é dependente do contexto e não pode ser observada em situações novas ou situações em que o indivíduo é submetido a uma grande quantidade de estímulos (Sagvolden et al., 2005; Wickens et al., 2011). Ratos da linhagem SHR (*spontaneous hypertensive rat*), que estão entre os modelos animais mais utilizados para o estudo do TDAH, não diferem dos controles no início dos testes, mas apresentam marcada hiperatividade com a progressão dos testes (Sagvolden, 2000). De modo semelhante, crianças com TDAH não se mostram hiperativas durante o início das consultas ou exames clínicos, mas mostram níveis crescentes de atividade na medida em que o tempo passa (Wickens et al., 2011). Esta influência do grau de novidade (ou não familiaridade) nos níveis de atividade se opõe a ideia de uma hiperatividade locomotora constante e involuntária no TDAH. Esta característica tem sido considerada de grande importância quando se considera a validade de modelos animais, uma vez que muitos autores se concentram apenas em obter modelos com altos níveis de atividade locomotora em qualquer condição experimental.

Outro fator que pode influenciar os resultados em testes de campo aberto é o tipo de recipiente utilizado (Russell, 2011). Em acordo com esta ideia, em um estudo realizado em nosso laboratório durante o mesmo período do presente estudo, seguindo o mesmo protocolo

de exposição ao etanol, mas utilizando outro recipiente para o teste de campo aberto (caixa de madeira, paredes negras, 45cm x 45cm x 45cm), observamos uma marcante hiperatividade locomotora em testes realizados entre 14:00 e 17:00h. Em um estudo realizado em nosso laboratório entre 2008 e 2010 também encontramos hiperatividade locomotora em camundongos Suíços expostos ao etanol de modo idêntico ao do presente estudo, mas utilizando um terceiro recipiente como campo aberto (caixa de polipropileno, 37,6 cm × 30,4 cm × 17cm) e testando os animais entre 13:30 e 17:00h com as luzes da sala de teste acesas (Nunes et al., 2011). De modo interessante, no presente estudo, os animais expostos ao etanol não diferiram dos animais expostos à salina no início do teste e na medida em que o teste progrediu a hiperatividade se tornou mais evidente. No estudo realizado por Nunes e colaboradores (2011) os animais expostos ao etanol foram hiperativos ao longo de todos os intervalos de tempo dos 10 minutos de teste. Vale mencionar que um padrão semelhante de hiperatividade é observado quando a atividade locomotora é medida em rodas de atividade (situação experimental de baixíssima novidade) onde os animais expostos ao etanol apresentam hiperatividade locomotora que pode ser observada com facilidade do momento em que as luzes se apagam até a hora em que são acesas (Sakata-Haga et al., 2006).

Com base nesses dados, é possível especular que as diferenças com relação ao tamanho e/ou material das caixas utilizadas como recipientes de teste tenham contribuído para que o grau de novidade que os animais foram expostos tenha variado em cada um dos nossos estudos. Particularmente, o recipiente utilizado no presente estudo pode oferecer ao animal uma carga de estimulação mais acentuada que os recipientes utilizados nos outros estudos e, portanto, constitua um ambiente menos favorável a manifestação da hiperatividade locomotora. Neste caso, o fato de que a exposição neonatal ao etanol promoveu hiperatividade locomotora apenas no grupo de animais testados entre 00:00 e 1:30h deve ser interpretado com cautela. Este horário não deve ser tomado como o único momento para observação da hiperatividade, mas sim deve ser considerado o momento mais favorável à manifestação da hiperatividade. Desta forma, nossos dados sugerem que os distúrbios funcionais nos circuitos corticoestriatais responsáveis pela hiperatividade locomotora podem estar mais acentuados no final da fase escura do que nas demais fases do ciclo claro escuro.

4.8 Efeito da exposição precoce ao etanol na expressão dos genes de controle do ritmo circadiano

Nossos dados mostrando diferenças entre os animais dos grupos ETOH e SALINA na expressão dos genes *Per 1* está em acordo com alguns estudos que mostram que durante o período de surto de crescimento cerebral a exposição ao etanol prejudica a capacidade de gerar ritmos endógenos do núcleo supraquiasmático (Allen et al., 2004; Allen et al., 2005b; Handa et al., 2007). Ratos adultos expostos ao etanol de PN4 até PN9 mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12/12h por 21 dias aumentam prontamente sua atividade locomotora no *running wheel* se as luzes do ambiente são apagadas 6 horas antes do horário habitual enquanto que os animais dos grupos não-manipulado ou controle submetidos as mesmas condições mantêm seu ritmo por pelo 10 minutos após o apagar das luzes e levam de quatro a cinco dias a mais que animais expostos ao etanol para se reajustar ao novo regime de claro e escuro (Allen et al., 2005a). Ratos expostos ao etanol entre PN4 e PN9 mantidos em total escuridão a partir dos 5 meses de vida apresentam, quando comparados aos controles, diminuição seguida pela perda do ritmo circadiano na produção de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) no núcleo supraquiasmático (Allen et al., 2004).

Embora os mecanismos específicos pelos quais o etanol é capaz de afetar os ritmos circadianos ainda não sejam conhecidos, alguns autores tem sugerido que estes distúrbios podem estar associados com as alterações causadas pelo etanol no desenvolvimento do núcleo supraquiasmático e/ou nas vias envolvidas com a transmissão da informação luminosa para o núcleo supraquiasmático (Allen et al., 2004; Allen et al., 2005b; Handa et al., 2007). Uma das possibilidades envolve o fato de que a exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral promove um grande aumento da neuroapoptose em diversas regiões cerebrais (McGee e Riley, 2006). Em acordo com esta ideia, a exposição a 4,5 g/kg de etanol promove uma pequena, mas significativa redução na densidade celular no núcleo supraquiasmático de ratos que podem representar uma grande redução na conectividade sináptica intranuclear (Farnell et al., 2004). Como o relógio supraquiasmático consiste de um conjunto de osciladores autônomos que são endogenamente capazes de gerar ritmo (Welsh et al., 1995), as alterações na comunicação sináptica causadas pelo etanol podem prejudicar o acoplamento e a sincronização dos múltiplos osciladores e assim comprometer propriedades básicas como a sua regulação pela luz (Allen et al., 2005a).

Outra explicação possível é que a exposição neonatal ao etanol pode afetar de modo permanente o desenvolvimento do sistema visual. A exposição ao etanol durante o período perinatal causa hipoplasia e diminuição da mielinização dos axônios do nervo óptico (Harris et al., 2000; Pinazo-Duran et al., 1997). Além disso, exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral induz um aumento da neuroapoptose tanto das células ganglionares da retina como nos neurônios do núcleo geniculado lateral (Tenkova et al., 2003). Vale mencionar que o período de surto de crescimento cerebral é crítico para formação das sinapses entre as fibras do trato retino-hipotalâmico com o núcleo supraquiasmático (Speh e Moore, 1993). É possível ainda que a exposição ao etanol iniba o refinamento das projeções do trato retino-hipotalâmico que ocorre em ratos entre PN6 e PN10 (Moore, 1991).

Finalmente, não se pode descartar o fato de que a exposição ao etanol afete os níveis de substratos neuroquímicos responsáveis pela função do núcleo supraquiasmático. Dentre estes substratos estão o fotopigmento melanopsina e o neurotransmissor polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (PACAP) que mediam a transdução da informação luminosa no núcleo supraquiasmático. O primeiro presente nas células ganglionares da retina (Hattar et al., 2002) e o segundo é o principal neurotransmissor da via retinohipotalâmica (Hannibal, 2002). Tem sido sugerido que algumas alterações de ritmo circadiano decorrentes da exposição precoce do etanol podem ser causadas pelo aumento da fototransdução mediada pela melanopsina ou pela potenciação do papel do PACAP na transmissão no núcleo supraquiasmático (Allen et al., 2005b). Outras moléculas importantes podem ser os nucleotídeos cíclicos AMPc e o GMPc que participam da regulação dos ritmos do núcleo supraquiasmático (Feil et al., 2009; Ferreyra e Golombek, 2000). Vale mencionar que um número crescente de evidências sugere que a grande gama de distúrbios neurocomportamentais causados pela exposição gestacional ao etanol durante o terceiro trimestre, tem como um denominador comum uma diminuição das funções celulares mediadas pelos segundos-mensageiros AMPc e GMPc (Filgueiras et al., 2010; Lantz et al., 2012; Medina, 2011; Nunes et al., 2011; Paul et al., 2010).

4.9 A hiperatividade locomotora causada pela exposição precoce ao etanol pode estar associada com as perturbações no sistema de controle do ritmo circadiano do núcleo supraquiasmático

Neste estudo observamos que os efeitos da exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral na atividade locomotora e no sistema de controle do ritmo circadiano ocorreram apenas em um dos horários da fase escura do ciclo circadiano. Particularmente, a hiperatividade locomotora ocorreu apenas no final da fase escura (entre 0:00h e 1:00h) e uma redução na expressão do gene *Per1* no núcleo supraquiasmático ocorreu no meio da fase escura (entre 18:00h e 19:30h).

De modo interessante, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *PER1* foram observados em indivíduos com o TDAH (Lasky-Su et al., 2008). Como o núcleo supraquiasmático controla os relógios periféricos por meio de um circuito comum de transcrição de genes de relógio e que a exposição precoce ao etanol afeta os sistemas de controle de ritmo do núcleo supraquiasmático, é possível que a alteração na expressão do gene *Per1* esteja associada com a alteração de ritmo em estruturas cerebrais que estão envolvidas com a manifestação do TDAH. Dentre estas estruturas o córtex pré-frontal merece especial atenção. Uma série de estudos tem associado os distúrbios neurocomportamentais observados no TDAH como a hiperatividade locomotora com a disfunção do córtex pré-frontal (Arnsten, 2011; Durston et al., 2011; Liston et al., 2011; Sagvolden et al., 2005). Muitas das funções mediadas pelo córtex pré-frontal como a atenção (Kraemer et al., 2000) e o humor (Owens et al., 2000) exibem um padrão circadiano estereotipado. Além disso, o córtex infralímbico, a porção mais ventral do córtex pré-frontal medial recebe, via núcleo paraventricular do tálamo, um grande número de projeções provenientes do núcleo supraquiasmático (Sylvester et al., 2002).

Considerando que deve haver um intervalo de tempo entre a expressão dos genes de relógio e a efetiva transformação na função celular nas células dos tecidos alvo, é razoável supor que as alterações na atividade locomotora observadas apenas no grupo de animais testados entre 0:00 e 1:30h poderiam ser decorrentes de uma alteração prévia na expressão dos genes de relógio que regulam a função de estruturas como o córtex pré-frontal. Vale mencionar ainda que, de modo oposto ao observado entre 18:00 e 19:30h, a expressão de *Per1* parece estar aumentada no grupo de animais expostos ao etanol no intervalo entre 0:00 e 1:30h. Desta forma, novos estudos devem ser conduzidos para investigar melhor esta

hipótese. Particularmente, deveremos investigar a expressão dos genes de relógio no córtex pré-frontal medial e no núcleo supraquiasmático em diferentes intervalos de tempo entre 18:00 e 1:30h.

CONCLUSÕES

- a) O horário de realização dos testes foi determinante para a manifestação da hiperatividade locomotora causada pela exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral. Particularmente, foi possível encontrar um efeito da exposição precoce ao etanol somente no grupo de animais testados entre 00:00 e 01:30, quando animais que receberam álcool apresentaram hiperatividade comparados ao animais que receberam salina. Nos demais horários de realização dos testes os tratamentos não demonstraram diferença significativa na atividade locomotora.

- b) A exposição ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral afetou a expressão dos genes de controle do ritmo circadiano. Animais tratados com álcool apresentaram uma expressão do gene *Per1* menor que os animais tratados com salina entre 18:00 e 19:30h.

REFERÊNCIAS

- Acheson SK, Ross EL, Swartzwelder HS. Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. *Alcohol* 2001; 23: 167-175.
- Agapito M, Mian N, Boyadjieva NI, Sarkar DK. Period 2 gene deletion abolishes beta-endorphin neuronal response to ethanol. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2010; 34: 1613-1618.
- Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2003; 13: 271-277.
- Allen GC, Farnell YZ, Maeng JU, West JR, Chen WJ, Earnest DJ. Long-term effects of neonatal alcohol exposure on photic reentrainment and phase-shifting responses of the activity rhythm in adult rats. *Alcohol* 2005a; 37: 79-88.
- Allen GC, West JR, Chen WJ, Earnest DJ. Developmental alcohol exposure disrupts circadian regulation of BDNF in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurotoxicol.Teratol.* 2004; 26: 353-358.
- Allen GC, West JR, Chen WJ, Earnest DJ. Neonatal alcohol exposure permanently disrupts the circadian properties and photic entrainment of the activity rhythm in adult rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2005b; 29: 1845-1852.
- Anderson LL, Scanes CG. Nanobiology and physiology of growth hormone secretion. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2012; 237: 126-142.
- Anthony B, Vinci-Booher S, Wetherill L, Ward R, Goodlett C, Zhou FC. Alcohol-induced facial dysmorphology in C57BL/6 mouse models of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol* 2010; 44: 659-671.
- Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst A, Riley EP, Mattson SN, Jernigan TL. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Dev.Med.Child Neurol.* 2001; 43: 148-154.
- Arnsten AF. Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biol.Psychiatry* 2011; 69: e89-e99.
- Balachova T., Bonner B., Chaffin M, Bard D., Isurina G., Tsvetkova L. Women's Alcohol Consumption and Risk for Alcohol-Exposed Pregnancies in Russia. *Addiction* 2011;
- Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009; 106: 14108-14113.
- Becker HC, Diaz-Granados JL, Randall CL. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1996; 55: 501-513.

- Berman RF, Hannigan JH. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. *Hippocampus* 2000; 10: 94-110.
- Bhatara V, Loudenberg R, Ellis R. Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J.Atten.Disord.* 2006; 9: 515-522.
- Bijlenga D, Van Someren EJ, Gruber R, Bron TI, Kruithof IF, Spanbroek EC e colaboradores. Body temperature, activity and melatonin profiles in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and delayed sleep: a case-control study. *J.Sleep Res.* 2013; 22: 607-616.
- Blagrove M, Fouquet NC, Baird AL, Pace-Schott EF, Davies AC, Neuschaffer JL e colaboradores. Association of salivary-assessed oxytocin and cortisol levels with time of night and sleep stage. *J.Neural Transm.* 2012; 119: 1223-1232.
- Blaine K, Gasser K, Conway S. Influence of fetal alcohol exposure on the GABAergic regulation of growth hormone release in postnatal rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1999; 23: 1681-1690.
- Blomqvist M, Holmberg K, Fernell E, Ek U, Dahllof G. Dental caries and oral health behavior in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur.J.Oral Sci.* 2007; 115: 186-191.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N e colaboradores. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol.Psychiatry* 2006; 11: 934-953.
- Burd L, Klug MG, Martsof JT, Kerbeshian J. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicol.Teratol.* 2003; 25: 697-705.
- Careau V, Bininda-Emonds OR, Ordonez G, Garland T, Jr. Are voluntary wheel running and open-field behavior correlated in mice? Different answers from comparative and artificial selection approaches. *Behav.Genet.* 2012; 42: 830-844.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age - United States, 1991-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 529-532.
- 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. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2001; 25: 235-260.
- Clarren SK. Neuropathology in fetal alcohol syndrome. West JR (Eds.). *Alcohol and Brain Development.*Oxford University Press, New York. 1986;
- Comas M and Hut RA. Twilight and Photoperiod Affect Behavioral Entrainment in the House Mouse (*Mus musculus*). *J Biol Rhythms* 2009 24: 403
- Conway S, Garbouzova Y. Effect of fetal alcohol exposure on postnatal pituitary adenosine 3', 5'-cyclic phosphate content and growth hormone release. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1996; 20: 1212-1220.

- Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005; 230: 389-393.
- Diaz J, Samson HH. Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science* 1980; 208: 751-753.
- Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum.Dev.* 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.
- Dopheide JA, Pliszka SR. Attention-deficit-hyperactivity disorder: an update. *Pharmacotherapy* 2009; 29: 656-679.
- Dueck A., Thome J., Haessler F. The role of sleep problems and circadian clock genes in childhood psychiatric disorders. *J Neural Transm* 2012; 119: 1097-1104.
- Durston S, van B, de ZP. Differentiating frontostriatal and fronto-cerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol.Psychiatry* 2011; 69: 1178-1184.
- Earnest DJ, Chen WJ, West JR. Developmental alcohol and circadian clock function. *Alcohol Res.Health* 2001; 25: 136-140.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL e colaboradores. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1998; 22: 998-1040.
- Farnell YZ, Allen GC, Nahm SS, Neuendorff N, West JR, Chen WJ e colaboradores. Neonatal alcohol exposure differentially alters clock gene oscillations within the suprachiasmatic nucleus, cerebellum, and liver of adult rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2008; 32: 544-552.
- Farnell YZ, Allen GC, Neuendorff N, West JR, Wei-Jung AC, Earnest DJ. Effects of neonatal alcohol exposure on vasoactive intestinal polypeptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Alcohol* 2009; 43: 387-396.
- Farnell YZ, West JR, Chen WJ, Allen GC, Earnest DJ. Developmental alcohol exposure alters light-induced phase shifts of the circadian activity rhythm in rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2004; 28: 1020-1027.
- Feder ME, Garland T Jr, Marden JH, Zera AJ (2010) Locomotion in response to shifting climate zone: not so fast. *Annu Rev Physiol* 72:167–190
- Feil R, Holter SM, Weindl K, Wurst W, Langmesser S, Gerling A e colaboradores. cGMP-dependent protein kinase I, the circadian clock, sleep and learning. *Commun.Integr.Biol.* 2009; 2: 298-301.
- Ferreira GA, Golombek DA. Cyclic AMP and protein kinase A rhythmicity in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 2000; 858: 33-39.

- Filgueiras CC, Krahe TE, Medina AE. Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. *Neurosci.Lett.* 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. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2009; 93: 148-154.
- Forbes A, Cooze J, Malone C, French V, Weber JT. Effects of intermittent binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats. *Alcohol* 2013; 47: 95-102.
- Froy O. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr.Rev.* 2010; 31: 1-24.
- 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.
- Gilbertson RJ, Barron S. Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 2005; 81: 54-64.
- Goodlett CR., Horn KH., Zhou FC. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005; 230: 394-406.
- Goodlett CR, Horn KH. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res.Health* 2001; 25: 175-184.
- Goto Y, Grace AA. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int.Rev.Neurobiol.* 2007; 78: 41-68.
- Guilding C, Piggins HD. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur.J.Neurosci.* 2007; 25: 3195-3216.
- 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.
- Han JY, Joo Y, Kim YS, Lee YK, Kim HJ, Cho GJ e colaboradores. Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Mol.Cells* 2005; 20: 189-195.
- Handa RJ, Zuloaga DG, McGivern RF. Prenatal ethanol exposure alters core body temperature and corticosterone rhythms in adult male rats. *Alcohol* 2007; 41: 567-575.
- Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* 2002; 309: 73-88.

Hannigan JH., Berman RF. Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and environmental treatments. *Neurotoxicol.Teratol.* 2000; 22: 103-111.

Hannigan JH. What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 1996; 55: 489-499.

Hannigan JH, Armant DR. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Semin.Neonatol.* 2000; 5: 243-254.

Hannigan JH, O'Leary-Moore SK, Berman RF. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2007; 31: 202-211.

Harris SJ, Wilce P, Bedi KS. Exposure of rats to a high but not low dose of ethanol during early postnatal life increases the rate of loss of optic nerve axons and decreases the rate of myelination. *J.Anat.* 2000; 197 Pt 3: 477-485.

Harris SR, MacKay LL, Osborn JA. Autistic behaviors in offspring of mothers abusing alcohol and other drugs: a series of case reports. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1995; 19: 660-665.

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 2002; 295: 1065-1070.

Henck, J. W. *Developmental Neurotoxicology: Testing and Interpretation.* Humana Press (Eds.). Handbook of Neurotoxicology. New Jersey. 2002.

Huynh H, Feldt LS. Estimation of BOX correction for degrees of freedom from sample data in randomized block and split-plot designs. *J.Edu.Statistics.* 1976; 1: 69-82.

Ieraci A, Herrera DG. Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *PLoS.Med.* 2006; 3: e101-

Ieraci A, Herrera DG. Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis. *Neurobiol.Dis.* 2007; 26: 597-605.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K e colaboradores. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000; 287: 1056-1060.

Imeraj L, Antrop I, Roeyers H, Deschepper E, Bal S, Deboutte D. Diurnal variations in arousal: a naturalistic heart rate study in children with ADHD. *Eur.Child Adolesc.Psychiatry* 2011; 20: 381-392.

Ironside S, Davidson F, Corkum P. Circadian motor activity affected by stimulant medication in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J.Sleep Res.* 2010; 19: 546-551.

Jones KL., Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 1973; 302: 999-1001.

Jones KL., Smith DW., Ulleland CN., Streissguth P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1973; 1: 1267-1271.

Kaneko M, Hoshino Y, Hashimoto S, Okano T, Kumashiro H. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 1993; 23: 59-65.

Kelly SJ, Lawrence CR. Intra-gastric intubation of alcohol during the perinatal period. *Methods Mol. Biol.* 2008; 447: 101-110.

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.

Kenzer AL, Ghezzi PM, Fuller T. Stimulus specificity and dishabituation of operant responding in humans. *J. Exp. Anal. Behav.* 2013; 100: 61-78.

Kiguchi M, Fujita S, Oki H, Shimizu N, Cools AR, Koshikawa N. Behavioural characterisation of rats exposed neonatally to bisphenol-A: responses to a novel environment and to methylphenidate challenge in a putative model of attention-deficit hyperactivity disorder. *J. Neural Transm.* 2008; 115: 1079-1085.

Kissling C, Retz W, Wiemann S, Coogan AN, Clement RM, Hunnerkopf R e colaboradores. A polymorphism at the 3'-untranslated region of the CLOCK gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2008; 147: 333-338.

Klejbor I, Ludkiewicz B, Turlejski K. Effect of light-dark changes on the locomotor activity in open field in adult rats and opossums. *Folia Morphol. (Warsz.)* 2013; 72: 300-305.

Klintsova AY, Goodlett CR, Greenough WT. Therapeutic motor training ameliorates cerebellar effects of postnatal binge alcohol. *Neurotoxicol. Teratol.* 2000; 22: 125-132.

Kogo M, Funk GD, Chandler SH. Rhythmical oral-motor activity recorded in an in vitro brainstem preparation. *Somatosens. Mot. Res.* 1996; 13: 39-48.

Kraemer S, Danker-Hopfe H, Dorn H, Schmidt A, Ehlert I, Herrmann WM. Time-of-day variations of indicators of attention: performance, physiologic parameters, and self-assessment of sleepiness. *Biol. Psychiatry* 2000; 48: 1069-1080.

Krahe TE, Filgueiras CC, Caparelli-Daquer EM, Schmidt SL. Contralateral rotatory bias in the free-swimming test after unilateral hemispherectomy in adult Swiss mice. *Int. J. Neurosci.* 2001; 108: 21-30.

Krain AL, Castellanos FX. Brain development and ADHD. *Clin. Psychol. Rev.* 2006; 26: 433-444.

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

Lantz CL, Wang W, Medina AE. Early alcohol exposure disrupts visual cortex plasticity in mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2012; 30: 351-357.

Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, et al. Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies

novel associations and confirms candidate gene associations. *Am.J.Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 2008; 147B: 1345-1354.

Lavialle M, Champeil-Potokar G, Alessandri JM, Balasse L, Guesnet P, Papillon C e colaboradores. An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters. *J.Nutr.* 2008; 138: 1719-1724.

Legastelois R, Botia B, Coune F, Jeanblanc J, Naassila M. Deciphering the relationship between vulnerability to ethanol-induced behavioral sensitization and ethanol consumption in outbred mice. *Addict.Biol.* 2013;

Leussis MP, Bolivar VJ. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2006; 30: 1045-1064.

Liston C, Malter CM, Teslovich T, Levenson D, Casey BJ. Atypical prefrontal connectivity in attention-deficit/hyperactivity disorder: pathway to disease or pathological end point? *Biol.Psychiatry* 2011; 69: 1168-1177.

Maier SE, West JR. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. *Alcohol Res.Health* 2001; 25: 168-174.

Masuo Y, Ishido M, Morita M, Sawa H, Nagashima K, Niki E. Behavioural characteristics and gene expression in the hyperactive wiggling (Wig) rat. *Eur.J.Neurosci.* 2007; 25: 3659-3666.

May PA, Fiorentino D, Coriale G, Kalberg WO, Hoyme HE, Aragon AS e colaboradores. Prevalence of children with severe fetal alcohol spectrum disorders in communities near Rome, Italy: new estimated rates are higher than previous estimates. *Int.J.Environment.Res.Public Health* 2011; 8: 2331-2351.

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

May PA, Gossage JP, Kalberg WO, Robinson LK, Buckley D, Manning M e colaboradores. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. *Dev.Disabil.Res.Rev.* 2009; 15: 176-192.

McGee CL, Riley EP. Brain imaging and fetal alcohol spectrum disorders. *Ann.Ist.Super.Sanita* 2006; 42: 46-52.

Medina AE. Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. *Front Neurosci.* 2011; 5: 21-

Melcer T, Gonzalez D, Barron S, Riley EP. Hyperactivity in preweanling rats following postnatal alcohol exposure. *Alcohol* 1994; 11: 41-45.

Moore, R. Y. Development of the suprachiasmatic nucleus. In D.C.Klein RYM&SMR (Eds.). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock* . Oxford University Press, New York. 1991.

de Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation role of adipocytokines and neuropeptides *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(3):176-88.

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

Nagy PM, Aubert I. B6eGFPChAT mice overexpressing the vesicular acetylcholine transporter exhibit spontaneous hypoactivity and enhanced exploration in novel environments. *Brain Behav.* 2013; 3: 367-383.

Nunes F, Ferreira-Rosa K, Pereira MS, Kubrusly RC, Manhaes AC, Abreu-Villaca Y e colaboradores. Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend.* 2011; 119: 81-87.

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

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

Owens DS, Macdonald I, Tucker P, Sytnik N, Totterdell P, Minors D e colaboradores. Diurnal variations in the mood and performance of highly practised young women living under strictly controlled conditions. *Br.J.Psychol.* 2000; 91 (Pt 1): 41-60.

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 Sci.* 1997; 61: 1269-1281.

Panda S., Hogenesch JB., Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 2002; 417: 329-335.

Pascoli V, Valjent E, Corbille AG, Corvol JC, Tassin JP, Girault JA e colaboradores. cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in response to d-amphetamine and methylphenidate in the prefrontal cortex in vivo: role of beta 1-adrenoceptors. *Mol.Pharmacol.* 2005; 68: 421-429.

Paul AP, Pohl-Guimaraes F, Krahe TE, Filgueiras CC, Lantz CL, Colello RJ e colaboradores. Overexpression of serum response factor restores ocular dominance plasticity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *J.Neurosci.* 2010; 30: 2513-2520.

Pereira DS, Tufik S, Pedrazzoli M. [Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes]. *Rev.Bras.Psiquiatr.* 2009; 31: 63-71.

Pinazo-Duran MD, Renau-Piqueras J, Guerri C, Stromland K. Optic nerve hypoplasia in fetal alcohol syndrome: an update. *Eur.J.Ophthalmol.* 1997; 7: 262-270.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur.J.Pharmacol.* 2003; 463: 3-33.

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

Reppert SM., Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418: 935-941.

Ribeiro-Carvalho A, Abreu-Villaca Y, Paes-Branco D, Filgueiras CC, Manhaes AC. Novelty affects paw preference performance in adult mice. *Animal Behaviour* 2010; 80: 51-57.

Riley EP., McGee CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005; 230: 357-365.

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, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol.Rev.* 2011; 21: 73-80.

Rosenthal SL, Vakili MM, Evans JA, Elliott JA, Gorman MR. Influence of photoperiod and running wheel access on the entrainment of split circadian rhythms in hamsters. *BMC.Neurosci.* 2005; 6: 41-

Russell VA. 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.* 2003; 27: 671-682.

Russell VA. Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *J.Neurosci.Methods* 2007; 161: 185-198.

Russell VA. Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Curr.Protoc.Neurosci.* 2011; Chapter 9: Unit9-

Sagvolden T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2000; 24: 31-39.

Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol.Psychiatry* 2005; 57: 1239-1247.

Sakata-Haga H, Dominguez HD, Sei H, Fukui Y, Riley EP, Thomas JD. Alterations in circadian rhythm phase shifting ability in rats following ethanol exposure during the third trimester brain growth spurt. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2006; 30: 899-907.

Schmidt SL, Filgueiras CC, Krahe TE. Effects of sex and laterality on the rotatory swimming behavior of normal mice. *Physiol Behav.* 1999; 65: 607-616.

Senecky Y., Weiss N., Shalev SA., Peleg D., Inbar D., Chodick G. Alcohol consumption during pregnancy among women in Israel. *J.Popul.Ther.Clin.Pharmacol.* 2011; 18: 261-272.

Seron-Ferre M, Valenzuela GJ, Torres-Farfan C. Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today* 2007; 81: 204-214.

Slawecki CJ, Thomas JD, Riley EP, Ehlers CL. Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat. *Alcohol* 2004; 34: 187-196.

Snedecor GW., Cochran WG. *Statistical methods*. Iowa State University Press 1967;

Speh JC, Moore RY. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 1993; 76: 171-181.

Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J.Pediatr.* 2007; 150: 175-9, 179.

Stratton K., Howe C., Battaglia F. *Fetal Alcohol Syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment*. National Academic Press, Washington D.C. 1996;

Suckow MA., Danneman P., Brayton C. *The laboratory mouse*. CRC Press, New York. 2001;

Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2005; 230: 366-375.

Swallow JG, Hayes JP, Koteja P, Garland T Jr Selection experiments and experimental evolution of performance and physiology. In: Garland T, Rose MR (eds) *Experimental evolution: concepts, methods, and applications of selection experiments*. University of California Press, Berkeley, 2009, p 301–351

Sylvester CM, Krout KE, Loewy AD. Suprachiasmatic nucleus projection to the medial prefrontal cortex: a viral transneuronal tracing study. *Neuroscience* 2002; 114: 1071-1080.

Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C e colaboradores. A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVLT. *EMBO J.* 1998; 17: 4753-4759.

Tenkova T, Young C, Dikranian K, Labruyere J, Olney JW. Ethanol-induced apoptosis in the developing visual system during synaptogenesis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003; 44: 2809-2817.

Thiel CM, MCP, Huston JP, Schwarting RK. High versus low reactivity to a novel environment: Behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 1999; 93: 243-251.

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 And SL, Riley EP. MK-801 can exacerbate or attenuate behavioral alterations associated with neonatal alcohol exposure in the rat, depending on the timing of administration. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 2001; 25: 764-773.

- Tran TD, Cronise K, Marino MD, Jenkins WJ, Kelly SJ. Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. *Behav. Brain Res.* 2000; 116: 99-110.
- Turman JE, Jr., Ajdari J, Chandler SH. NMDA receptor NR1 and NR2A/B subunit expression in trigeminal neurons during early postnatal development. *J. Comp Neurol.* 1999; 409: 237-249.
- van der Heijden KB, Smits MG, Van Someren EJ, Gunning WB. Idiopathic chronic sleep onset insomnia in attention-deficit/hyperactivity disorder: a circadian rhythm sleep disorder. *Chronobiol. Int.* 2005; 22: 559-570.
- van Esseveldt KE, Lehman MN, Boer GJ. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000; 33: 34-77.
- Van Veen MM, Kooij JJ, Boonstra AM, Gordijn MC, Van Someren EJ. Delayed circadian rhythm in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and chronic sleep-onset insomnia. *Biol. Psychiatry* 2010; 67: 1091-1096.
- Viala-Artigues J, Mechetti C. Histoire de l'alcool archéologie partie 1. Fédération des acteurs de l'alcoologie et de l'addictologie 2003;
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD e colaboradores. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 1994; 264: 719-725.
- Wainwright PE. Issues of design and analysis relating to the use of multiparous species in developmental nutritional studies. *J. Nutr.* 1998; 128: 661-663.
- Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J. Biol. Rhythms* 1998; 13: 100-112.
- Welch-Carre E. The neurodevelopmental consequences of prenatal alcohol exposure. *Adv. Neonatal Care* 2005; 5: 217-229.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; 14: 697-706.
- Werts RL, Van Calcar SC, Wargowski DS, Smith SM. Inappropriate Feeding Behaviors and Dietary Intakes in Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorder or Probable Prenatal Alcohol Exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2013;
- Wickens JR, Hyland BI, Tripp G. Animal models to guide clinical drug development in ADHD: lost in translation? *Br. J. Pharmacol.* 2011; 164: 1107-1128.
- Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T e colaboradores. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiol. Dis.* 2004; 17: 403-414.

Xu X, Breen G, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. Association study between a polymorphism at the 3'-untranslated region of CLOCK gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Behav. Brain Funct.* 2010; 6: 48-

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M e colaboradores. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000; 288: 682-685.

Zanquetta MM, Correa-Giannella ML, Monteiro MB, Villares SM. Body weight, metabolism and clock genes. *Diabetol. Metab Syndr.* 2010; 2: 53-