



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Claudia Daniele Bianco

**Efeitos do tratamento com vitamina D em déficits induzidos por  
exposição ao álcool e estresse no início da vida**

Florianópolis

2019

Claudia Daniele Bianco

**Efeitos do tratamento com vitamina D em déficits induzidos por  
exposição ao álcool e estresse no início da vida**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Neurociências da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de Mestre em  
Neurociências  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia de Souza Brocardo

Florianópolis

2019

## Ficha de identificação da obra

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bianco, Claudia Daniele  
Efeitos do tratamento com vitamina D em déficits  
induzidos por exposição ao álcool e estresse no início da  
vida / Claudia Daniele Bianco ; orientadora, Patricia de  
Souza Brocardo, 2019.  
67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Transtornos de Espectro Alcoólico  
Fetal. 3. Exposição pré-natal ao álcool.. 4. Vitamina D.  
. 5. Separação maternal. . I. de Souza Brocardo, Patricia .  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Neurociências. III. Título.

Claudia Daniele Bianco

**Efeitos do tratamento com vitamina D em déficits induzidos por  
exposição ao álcool e estresse no início da vida**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.º Dr.º Marcelo Farina

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.ª Dr.ª Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.ª Dr.ª Leandra Constantino

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

---

Prof.º Dr.º Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

Coordenador(a) do Programa

---

Prof.ª Dr.ª Patricia de Souza Brocardo

Orientadora

Florianópolis, 2019.

Este trabalho é dedicado a todos que de alguma forma  
contribuíram ao longo deste processo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e meu guia espiritual, obrigada por todas as energias positivas e coragem nos momentos mais desafiadores.

Um super obrigada a toda minha família, meus pais Celito e Nelci, meus irmãos Celito e Victor, minha sobrinha Larissa e minha cunhada Rosiane. Vocês, mesmo morando longe, continuam sendo um porto seguro. Pai e mãe, não tenho palavras para agradecer por toda ajuda e força que vocês me passam. Amo vocês para sempre!!

Ao meu amor, meu marido Francisco, muito obrigada por ser esta companhia maravilhosa em todos os momentos e por insistir em me fazer voar quando eu tento me segurar no chão. Agradeço também a minha nova família, Rodrigo e Karol, Chiquinho e Douglas, Dona Deici, Fer e Vânia. Se tornaram muito especiais em minha vida!!

Muito obrigada professora Patricia, minha orientadora, que se tornou uma amiga e, mais que isso, é uma mãe para todos no nosso laboratório. Sem sua energia, esforço e dedicação eu jamais teria alcançado o tão sonhado “fim”.

A toda família LANEP, vocês são sensacionais!! Ian, meu companheiro de mestrado e de tantos momentos difíceis nessa jornada. Obrigada por me aturar nas crises de ansiedade e por compartilhar as comidas de conforto. Evelini, uma grande amiga sempre disposta a ajudar e trocar conhecimentos, principalmente estatísticos. Muito grata por nossas longas conversas e por me ajudar a sempre ver as coisas de outro ângulo. Tine, sempre preocupada e prestativa, chorou comigo no momento da primeira eutanásia, mas ficou do meu lado até eu conseguir fazer sozinha. Obrigada, de coração, por toda a força nesse processo. Bianca, você superou todas as minhas expectativas, és uma super profissional, conte comigo no que precisar. Marina, obrigada por ser tão carinhosa e amar tanto o que faz, você se tornou uma grande amiga, daquelas que sempre podemos contar. Fabi, agradeço por sua amizade, dedicação e “esperteza”, tantas vezes me ensinou coisas úteis!! Você é sensacional!! André por todos os momentos compartilhados, por seu amor ao nosso projeto e por dividir conosco seus anseios e sua empolgação. Todos vocês são muito especiais! Agradeço ainda às novas integrantes de nossa equipe, Pâmela e Bruna, tenho certeza que serão ótimas pesquisadoras.

Muito obrigada Scheilinha, por ser essa grande amiga e por tudo que já vivemos juntas, especialmente a semana que compartilhamos em Campos do Jordão e por sua força nas minhas tomadas de decisão para finalizar o mestrado. Grata a todas as meninas que estavam conosco nessa semana, especialmente à Carol e sua auriculoterapia sensacional!!

Agradeço a toda equipe do laboratório da professora Manuella, Nicolle, Bruna, Axel e Fernanda. Grata por permitirem que usássemos o seu laboratório e muitos materiais que não tínhamos no nosso. Também pelos momentos de descontração e cafés compartilhados.

Agradeço imensamente à Pri, por ser tão paciente, dispor de tantos dias para nos ensinar técnicas, e por sempre responder prontamente todos os meus áudios, que não foram poucos. Você me ensinou a não ter vergonha de pedir as coisas, e que todos precisamos nos ajudar, para conseguir realizar nosso trabalho. Deixo meus agradecimentos também à Dai, que se dispôs a ensinar algumas avaliações e disponibilizou seus materiais de doutorado.

Muito grata ao laboratório do professor Rui, que tão prontamente permitiu que eu usasse a sala de comportamentos para ratos, isso foi essencial para concretizar esse mestrado. Agradeço especialmente à Bruna, que por tantos dias me aguardou até tarde para fechar a sala e agendou os horários sempre que precisei. Super obrigada à Gisa, que muitas vezes me confiou sua chave para que eu pudesse entrar nos finais de semana.

Ao laboratório do professor Rodrigo, que sempre emprestou a bomba de perfusão e ao laboratório da professora Carla, por permitir que usássemos a guilhotina. Como é bom poder contar uns com os outros.

Obrigada à Luciana, veterinária do CCB, por nos treinar e nos atender todas as vezes que tínhamos dúvidas, necessidades ou problemas. Agradeço ao Wilson, por sempre manter a ordem e nos auxiliar na manutenção dos biotérios, também pelo carinho com nossos animais.

Grata a todos que compõem o PPGNeuro, professores, coordenação, colegas. Especialmente ao professor Eduardo, que prontamente me apoiou na antecipação da defesa, ao professor Marcelo por aceitar presidir a banca, à Leandra, à Fabiana e à professora Ariane, que não é da neuro, mas me acolheu na bioquímica, muito obrigada por aceitarem contribuir na avaliação de minha pesquisa.

Obrigada a toda a equipe da secretaria integrada dos PPGs do CCB, sempre muito atenciosos em esclarecer todas as dúvidas e ajustar todas as pendências.

Agradeço à UFSC, que tem sido minha segunda casa nos últimos 7 anos, e à CAPES, pelo apoio financeiro, mesmo nestes períodos obscuros.

Por fim, meu muito obrigada, mas, acima de tudo, todo meu respeito e meu pedido de perdão, aos animais que nasceram e morreram ao longo desta pesquisa.

*O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas apenas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o luto, o desalento e a lamentação. E por isso, de uma maneira especial, nós adquirimos sabedoria e conhecimento e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão nos tornamos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas estas coisas nós temos de suportar do encéfalo quando não está sadio... Nesse sentido, opino que é o encéfalo quem exerce o maior poder sobre o homem. (Hipócrates, Sobre a Doença Sagrada – Séc. IV a.C.)*



## RESUMO

Com intuito de melhor representar a etiologia dos Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal, a presente pesquisa utilizou um protocolo de exposição precoce ao álcool combinado com um estresse psicológico no início da vida através de um protocolo de separação materna (SM). Além disso, um tratamento repetido com vitamina D foi testado. Foram organizados 16 grupos experimentais (n=8) separados em machos e fêmeas. A exposição ao álcool (5g/kg/dia, i.p.) ocorreu pontualmente nos dias 04, 06, 08 e 10 do período pós-natal, essa janela temporal corresponde ao período do desenvolvimento relacionado ao terceiro trimestre da gestação em humanos. O protocolo de estresse por SM ocorreu entre os dias 02 e 14 por três horas diárias. A vitamina D foi administrada nos animais a partir do dia 22 e seguiu por 15 dias, período correspondente à infância tardia em humanos. Os testes comportamentais foram realizados entre os dias 40 e 45, período relacionado ao início da adolescência em humanos. Os testes utilizados buscaram avaliar a atividade locomotora, o comportamento tipo-ansioso e o comportamento tipo-depressivo. Também foi avaliado o peso da prole, durante a amamentação e após o desmame. Os resultados mostram que, tanto a exposição ao álcool quanto o estresse por SM, reduziram o peso das fêmeas, mas não dos machos, durante o período de amamentação. Além disso, esta diferença foi proeminente nos animais tratados com vitamina D. Da mesma forma, as fêmeas, mas não os machos, apresentaram hiperatividade independentemente do modelo de estresse precoce. Este resultado foi observado principalmente nos animais tratados com vitamina D. Nos parâmetros relacionados à ansiedade, houve aumento do comportamento tipo-ansioso nos animais expostos ao EtOH em comparação com o controle salina. O tratamento com vitamina D preveniu esse comportamento, sugerindo um papel ansiolítico deste tratamento. Além disso, no teste do campo aberto, os animais dos grupos de SM permaneceram menos tempo nos cantos em comparação com os controles. O comportamento tipo-depressivo não foi observado nos animais tratados expostos ao EtOH e/ou a SM e avaliados na adolescência. Em conclusão, este é o primeiro trabalho a demonstrar que o tratamento com vitamina D no período da infância, pode reduzir comportamento tipo-ansioso induzido por EPA em ratos adolescentes. No entanto, este mesmo tratamento parece exacerbar a hiperatividade nas fêmeas que sofreram SM ou protocolo combinado EtOH+SM.

**Palavras-chave:** Transtornos de Espectro Alcoólico Fetal. TEAF. Exposição pré-natal ao álcool. Vitamina D. Separação maternal. Estresse precoce.

## ABSTRACT

To better represent the etiology of Fetal Alcohol Spectrum Disorders, the present study used an early alcohol exposure protocol combined with early psychological stress through a maternal separation (MS) protocol. Also, repeated vitamin D treatment was tested. Sixteen experimental groups (n = 8) were divided into males and females. Exposure to alcohol (5g / kg/day, i.p.) occurred punctually on days 04, 06, 08, and 10 of the postnatal period; this temporal window corresponds to the developmental period related to the third trimester of gestation in humans. The stress protocol for MS occurred between 2 and 14 days for three hours daily. Vitamin D was administered to animals from day 22 and followed for 15 days, a period corresponding to late childhood in humans. Behavioral tests were performed between 40 and 45 days, a period related to early adolescence in humans. The behavioral tests used sought to evaluate the locomotor activity, anxious-type behavior, and depressive-type behavior. The bodyweight of the animals was assessed during breastfeeding and after weaning. The results show that both alcohol exposure and MS stress reduced the weight of females, but not males, during breastfeeding. In addition, this difference was prominent in vitamin D treated animals. Similarly, females, but not males, showed hyperactivity regardless of the early stress model. This result was observed mainly in animals treated with vitamin D. There was an increase in anxious-type behavior in animals exposed to EtOH compared to saline control. Vitamin D treatment prevented this behavior, suggesting an anxiolytic role of this treatment. In addition, in the open field test, animals from the MS groups spent less time in the corners compared to controls. Depressive-like behavior was not observed in the animals exposed to EtOH and/or MS and evaluated in adolescence. In conclusion, this is the first work to demonstrate that vitamin D treatment in childhood can reduce EPA-induced anxious behavior in adolescent rats. However, this same treatment seems to exacerbate hyperactivity in females that underwent MS or EtOH + MS combined protocol.

**Keywords:** Fetal Alcohol Spectrum Disorders. FASD. Prenatal alcohol exposure. D vitamin. Maternal separation. Early life stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vias da biotransformação do etanol .....	19
Figura 2 - Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF). TEAF é um termo guarda-chuva que contempla os déficits causados por consumo de álcool materno. ....	22
Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais. ....	29
Figura 4 - Protocolo experimental.....	30
Figura 5 - Organização da sequência de testes comportamentais. ....	32
Figura 6 - Imagem representativa da organização sequencial do comportamento de autolimpeza, padronizada pelo grupo de pesquisa de Alan Kalueff.....	33
Figura 7 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM na atividade locomotora em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste do campo aberto (n=8). ....	40
Figura 8 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansioso em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste do campo aberto. ....	42
Figura 9 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansioso em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste de comportamento de autolimpeza, nos parâmetros latência para autolimpeza e tempo total de autolimpeza. ....	44
Figura 10 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansiedade em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste de comportamento de autolimpeza, no parâmetro tempo de autolimpeza rostral.....	44
Figura 11 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansiedade em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste de comportamento de autolimpeza, no parâmetro tempo de autolimpeza corporal.....	45
Figura 12 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-depressivo em ratos adolescentes (DPN 45), através do teste do nado forçado (n=16). ....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da exposição ao álcool e estresse por SM na massa corporal (g) da prole. ....	35
Tabela 2 - Efeito de EPA, estresse por SM e tratamento com vitamina D no peso da prole após o período de amamentação.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

ADH - Álcool desidrogenase

ALDH - Aldeído desidrogenase

ANOVA – análise de variância

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CAS – concentração de álcool sanguíneo

CAT – Catalase

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CYP2E1 - citocromo P450 2E1

DCRA - Defeitos Congênitos Relacionados com o Álcool

DG - Dia gestacional

DNRA - Desordens Neurológicas Relacionadas com o Álcool

DPN – dia pós-natal

EPA - Exposição pré-natal ao álcool

E.P.M. – erro padrão da média

EROs - Espécies reativas de oxigênio

EtOH – Etanol

EtOH/nSM/Vei – grupo etanol não separado tratado com veículo

EtOH/nSM/VitD – grupo etanol não separado tratado com vitamina D

EtOH/SM/Vei – grupo etanol separado tratado com veículo

EtOH/SM/VitD – grupo etanol separado tratado com vitamina D

F - fêmeas

GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

g/kg – gramas por quilogramas

HHA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HO• - Radical hidroxila

IL-1 $\beta$  – interleucina 1 beta

i.p. - intraperitoneal

K<sup>+</sup> - Potássio

LTP – potenciação de longa duração

lx - lux

M – machos

MEOS - Sistema Microsomal de Oxidação do Etanol  
mg/dl – miligrama por decilitro  
mg/kg – miligrama por quilograma  
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro  
NAD<sup>+</sup> - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
NADH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
nSM – não separado maternalmente  
PFA - paraformaldeído  
pSAF - Síndrome Alcoólica Fetal parcial  
REF – refratário  
RES - respondente  
s - segundos  
SAF - Síndrome Alcoólica Fetal  
Sal/nSM/Vei – grupo salina não separado tratado com veículo  
Sal/nSM/VitD – grupo salina não separado tratado com vitamina D  
Sal/SM/Vei – grupo salina separado tratado com veículo  
Sal/SM/VitD – grupo salina separado tratado com vitamina D  
SM - Separação materna  
SNC - Sistema Nervoso Central  
TCA - Ácido tricarboxílico  
TDAH – Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade  
TEAF - Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
UI – unidades internacionais  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
VDR - Receptor de vitamina D

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁLCOOL .....	17
<b>1.1.1 Biotransformação do álcool no Sistema Nervoso Central.....</b>	<b>18</b>
1.2 EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL DURANTE O DESENVOLVIMENTO .....	20
1.3 TRANSTORNOS DO ESPECTRO ALCOÓLICO FETAL .....	21
1.4 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E OS TRANSTORNOS DO ESPECTRO ALCOÓLICO FETAL .....	22
<b>1.4.1 Formação Hipocampal .....</b>	<b>23</b>
1.5 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA.....	25
1.6 VITAMINA D .....	26
1.7 MODELO ANIMAL DE EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL DURANTE O NEURODESENVOLVIMENTO .....	27
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 ANIMAIS .....	28
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	29
4.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL DURANTE O DESENVOLVIMENTO .....	30
4.4 PROTOCOLO DE ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA POR SEPARAÇÃO MATERNA .....	31
4.5 TRATAMENTO COM VITAMINA D .....	31
4.6 PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS .....	31
<b>4.6.1 Teste do campo aberto.....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.2 Comportamento de autolimpeza.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6.3 Teste do nado forçado.....</b>	<b>34</b>
4.7 EUTANÁSIA.....	34
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 MASSA CORPORAL DA PROLE .....	35
<b>5.1.1 Massa corporal da prole antes do desmame.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1.2 Massa corporal da prole ao longo do tratamento com vitamina D ou veículo .....</b>	<b>36</b>
5.2 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	38
<b>5.2.1 Atividade locomotora.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.2 Comportamento tipo-ansioso.....</b>	<b>41</b>

5.4 COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA .....	43
5.5 TESTE DO NADO FORÇADO .....	46
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O álcool, cuja molécula ativa é o etanol (EtOH), é uma droga lícita que provoca dependência e causa inúmeros prejuízos à saúde física e mental, tanto de quem consome quanto de seu círculo familiar (MOYKKYNNEN & KORPI, 2012). O consumo de bebidas alcoólicas é culturalmente aceito e difundido ao redor do mundo e o uso desta substância por mulheres em idade reprodutiva é considerado uma importante questão de saúde pública (BARR & STREISSGUTH, 2001).

### 1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁLCOOL

Em adultos a absorção do álcool ocorre pelo processo de difusão simples em partes do tubo digestivo, se distribuindo pelos vasos sanguíneos e alcançando o fígado, onde passa pelo processo de oxidação por reações catalisadas pela enzima álcool desidrogenase (ADH); o sistema oxidante microsossomal do etanol (MEOS), formado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1); e a catalase (CAT), sendo biotransformado em acetaldeído, substância com alta capacidade de difusão (Figura 1). Em seguida o acetaldeído é transformado em acetato, uma substância altamente tóxica, através da enzima aldeído desidrogenase (ALDH).

A via predominante para o metabolismo do EtOH é através do sistema enzimático ADH hepático, que oxida o EtOH em acetaldeído com redução do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina ( $\text{NAD}^+$ ) para sua forma reduzida (NADH) no citosol.

Em indivíduos adultos que são consumidores crônicos de EtOH, uma segunda via, o sistema microsossomal de oxidação do etanol (MEOS), metaboliza o EtOH através do citocromo P450 2E1 (CYP2E1). O citocromo P450 é um complexo enzimático envolvido na desintoxicação de drogas e toxinas e a forma mais relacionada à biotransformação do álcool é o CYP2E1, que foi identificado em neurônios e células da glia em diferentes regiões do encéfalo (WARNER *et al.*, 1993). O CYP2E1 é induzido após a administração de álcool e, portanto, sua contribuição para a bioconversão desta substância aumenta após o consumo crônico de bebidas alcoólicas. A biotransformação do EtOH pelo CYP2E1 produz metabólitos oxidados (acetaldeído e acetato) no fígado e no encéfalo (HERNANDEZ *et al.*, 2016). A oxidação do EtOH via sistema microsossomal CYP2E1 consome NADPH da célula e pode levar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ) e o radical hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ) (MANSOURI *et al.*, 2001; ZAKHARI, 2013).

Além disso, a enzima catalase (CAT), presente nos peroxissomos, também pode desempenhar um papel na produção de acetaldeído a partir do EtOH presente no encéfalo (ZIMATKIN *et al.*, 2006). A atividade da CAT é dependente da concentração de peróxido de

hidrogênio ( $H_2O_2$ ), também tendo como produto final o acetaldeído. Esta é capaz de oxidar apenas uma pequena quantidade de EtOH, cerca de 2% do total ingerido (AGARWAL, 2001).

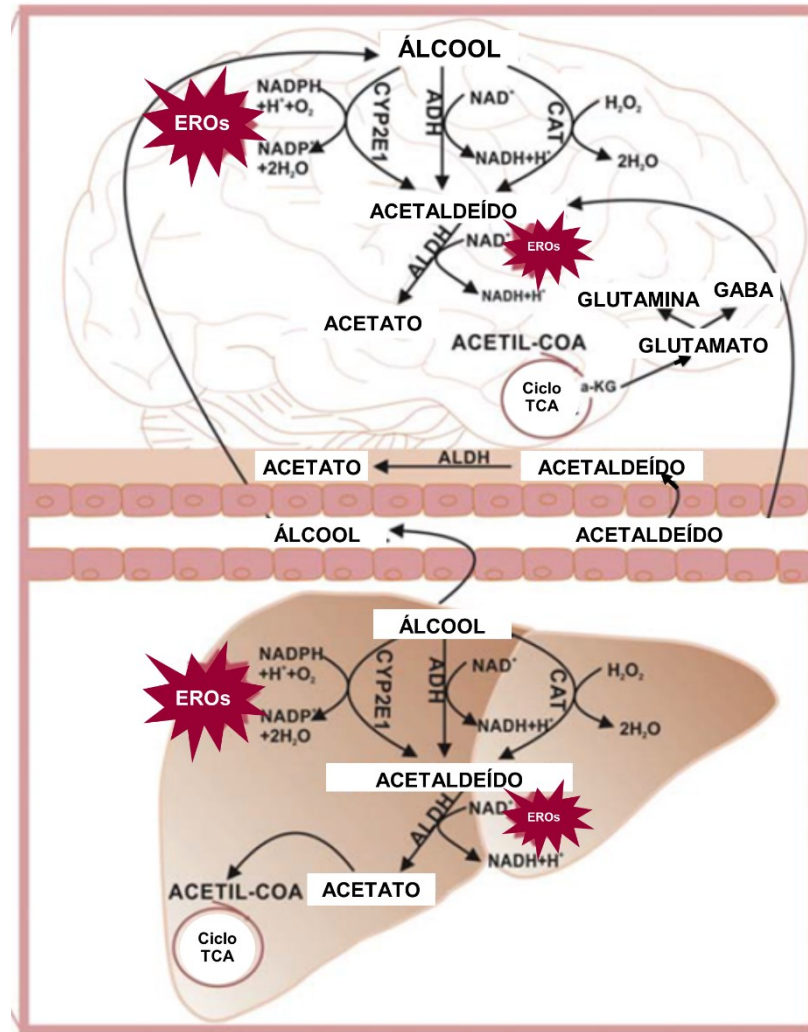
O acetaldeído pode ser posteriormente oxidado pela enzima ALDH, localizada na mitocôndria, formando o acetato e reduzindo o  $NAD^+$ . O acetato, por sua vez, pode ser convertido em acetil-coenzima A, a qual pode ser oxidada no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O  $\alpha$ -cetoglutarato de TCA pode ser usado como fonte de glutamato, glutamina ou Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). A biotransformação do álcool resulta na formação de NADH e, portanto, altera o estado redox celular. A re-oxidação do NADH através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial resulta na formação de EROs (Figura 1).

### 1.1.1 Biotransformação do álcool no Sistema Nervoso Central

Conforme apresentado anteriormente, nos tecidos periféricos, o acetaldeído é formado, principalmente, pela atividade da enzima ADH no fígado. Sabe-se que esta enzima não é expressa nos tecidos encefálicos (ZIMATKIN *et al.*, 2006, DEITRICH, 2011). Sob condições normais, o acetaldeído sistêmico não atravessa a barreira hematoencefálica (ERIKSSON, 1977; LINDROS & HILLBOM, 1979; PETERSON & TABAKOFF, 1979; STOWELL *et al.*, 1980). No entanto, dada à alta atividade da ALDH, a principal enzima responsável por metabolizar o acetaldeído dentro da barreira hematoencefálica, uma pequena quantidade de acetaldeído entra no encéfalo a partir da periferia (Figura 1) (HUNT, 1996; ZIMATKIN & BUBEN, 2007). Para ultrapassar a barreira hematoencefálica, o acetaldeído deve primeiro entrar nas células endoteliais ricas em ALDH2 (isoenzima de ALDH) na barreira, sendo oxidado. Foi demonstrado que em níveis mais elevados deste metabolito na periferia, quando as concentrações sistêmicas excedem 100 mM, este pode ser capaz de entrar rapidamente no encéfalo (QUERTEMONT *et al.*, 2005; TABAKOFF *et al.*, 1976).

O EtOH, por sua vez, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Desta forma, o acetaldeído pode ser gerado dentro do sistema nervoso central (SNC), a partir de EtOH, por meio da reação da CAT, e, em menor extensão, por CYP2E1, sendo que ambas as enzimas estão presentes no encéfalo (TAMPIER & MARDONES, 1979; ARAGON *et al.*, 1992; GILL *et al.*, 1992; ZIMATKIN *et al.*, 2006) (Figura 1). Estudos *in vitro* apontam que a CAT gera 60-70% do acetaldeído no encéfalo, enquanto a CYP2E1 gera cerca de 20% (ZIMATKIN *et al.*, 2006).

Figura 1- Vias da biotransformação do etanol



O álcool é biotransformado principalmente pela enzima álcool desidrogenase (ADH) para produzir acetaldeído. Em altos níveis de consumo de bebidas alcoólicas, o citocromo P450 2E1 (CYP2E1) está envolvido na bioconversão de álcool em acetaldeído. A catalase (CAT) metaboliza ~60% do álcool no encéfalo, onde falta ADH fisiologicamente ativa. O acetaldeído é oxidado em acetato principalmente pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). O acetato pode então ser convertido em acetil-coenzima A, que pode ser oxidada no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O  $\alpha$ -cetoglutarato de TCA pode ser usado como fonte de glutamato, glutamina ou GABA. A biotransformação do álcool resulta na formação de NADH e, portanto, altera o estado redox celular. A reoxidação do NADH através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Fonte: Gil-Mohapel *et al*, 2019, com adaptações.

A absorção do álcool pode variar conforme a concentração absoluta das bebidas, com a quantidade ingerida e com a motilidade do tubo digestivo. No entanto, durante a gestação, os níveis de álcool na corrente sanguínea permanecem elevados por mais tempo, devido ao esvaziamento gástrico ser mais lento e a motilidade intestinal estar diminuída, assim ocorre uma absorção mais lenta de álcool (ROTMAN, 1999, ARTEEL *et al.*, 2003).

## 1.2 EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Muitos países não têm uma recomendação clara sobre a abstinência de álcool durante a gestação, podendo tornar essa informação confusa para as mulheres, as quais podem continuar “bebendo socialmente” durante esse período (BROLESE *et al.*, 2014). Pesquisas mostram que 10 a 20% das mulheres grávidas na América do Norte consomem álcool no período de gravidez, 40% no Uruguai e mais de 50% em algumas partes da Itália (BROLESE *et al.*, 2014). No Brasil, estudos realizados com diferentes metodologias, estimam a frequência de consumo de álcool em torno de 10 a 40% das gestantes (KAUP *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2014). No entanto, ainda existe uma carência de dados epidemiológicos em nosso país.

O álcool ingerido por mulheres grávidas atravessa livremente a barreira placentária e se difunde tanto no líquido amniótico quanto no organismo do feto (BRIEN *et al.*, 1983). Durante o período fetal, o álcool causa a vasoconstrição placentária, o que reduz a oferta tanto de oxigênio quanto de nutrientes para o feto, ocasionando a diminuição da sua capacidade de crescimento (GUPTA *et al.*, 2016), levando a chances aumentadas de baixo peso ao nascer (BURD *et al.*, 2017). Ao atravessar a barreira placentária, o álcool, nas formas de EtOH e de acetaldeído, permanece durante mais tempo no líquido amniótico, pois a absorção será mais lenta do que no corpo da mãe. O feto ainda não possui um sistema eficaz para biotransformar o álcool, pois seu fígado não está totalmente desenvolvido, assim a eliminação dessa substância ocorrerá pela reentrada na circulação materna (JONES & SMITH, 1973).

Os mecanismos subjacentes aos danos encefálicos induzidos por exposição pré-natal ao álcool (EPA) permanecem obscuros. No entanto, sabe-se que esses danos podem resultar de ações diretas ou indiretas do EtOH no metabolismo de neurotransmissores, como serotonina (5-HT), glutamato e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), bem como na modulação de seus receptores e na indução de estresse oxidativo (BROCARDO *et al.*, 2011; CESCO NETTO *et al.*, 2016; PROSSER, MANGRUM & GLASS, 2008). Ainda, os efeitos diretos do EtOH no encéfalo em desenvolvimento também envolvem sua interação com uma ampla gama de receptores da superfície celular e canais de íons, incluindo GABA<sub>A</sub>, N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores 5-HT<sub>3</sub>, bem como a modulação dos canais cálcio (Ca<sup>2+</sup>) dependentes de voltagem do tipo L e os canais de potássio (K<sup>+</sup>) de retificação interna ativados pela proteína G (CREWS *et al.*, 1996; DAVIES, 2003). Além disso, as EROs geradas na presença do álcool têm a capacidade de danificar proteínas e lipídeos celulares. Estes fatores podem desencadear o aumento da apoptose, prejudicando as divisões celulares, a organogênese, além de ocasionar sérios prejuízos ao SNC em desenvolvimento (FREIRE *et al.*, 2005; COHEN- KEREM e KOREN, 2003).

Neste sentido, a EPA pode causar um conjunto de efeitos adversos no desenvolvimento do feto, incluindo deficiências no crescimento, malformações congênitas e importantes alterações neurológicas como déficits de aprendizagem, dificuldade de concentração, irritabilidade, problemas motores e transtornos do humor. Esses prejuízos comportamentais muitas vezes são percebidos apenas em idade escolar e acabam sendo subdiagnosticados, ou mesmo não vinculados ao consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação. Salienta-se que esses transtornos perduram ao longo de toda a vida do indivíduo afetado, gerando custos financeiros e emocionais, tanto para a sociedade quanto aos familiares envolvidos (POPOVA *et al*, 2013).

A EPA tem demonstrado causar múltiplos efeitos dependentes da dose na estrutura e função do SNC, sendo que a extensão do dano é dependente do padrão e da cronicidade da exposição, bem como dos estágios do desenvolvimento em que ocorre (RILEY & MCGEE, 2005). No que concerne ao neurodesenvolvimento, não existe um período considerado seguro durante a gestação para o consumo de bebidas alcoólicas. Ao longo do primeiro trimestre de gravidez, o consumo de álcool pode afetar a formação do tubo neural e das células da crista neural, levando a microcefalia, malformações oculares e a dismorfologias faciais. No segundo trimestre a EPA pode interferir na proliferação de precursores neuronais e na formação de células da glia radial levando a migração neuronal anormal. Por fim, durante o terceiro trimestre da gestação, a EPA pode alterar o pico de crescimento cerebral aumentando a morte celular, comprometendo a sinaptogênese e levando a déficits persistentes na plasticidade neuronal (GRINFELD, 2009).

### 1.3 TRANSTORNOS DO ESPECTRO ALCOÓLICO FETAL

A dose consumida, o período de exposição, o uso de outras drogas, o estado nutricional, fatores ambientais e a variabilidade genética podem refletir no quanto o álcool influencia no desenvolvimento fetal (MAY *et al.*, 2013; DÖRRIE *et al*, 2014). Essas características levaram ao estabelecimento do termo Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF), sendo adotado para qualquer alteração que resulte de EPA (JONES *et al*, 1973).

Conforme representado na Figura 2, TEAF é considerado um termo “guarda-chuva” que contempla diferentes graus de efeitos adversos resultantes do consumo de álcool durante a gestação, incluindo: a) Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), considerada a mais grave manifestação de EPA e ocorrendo mediante consumo crônico de altas doses de álcool. b) Defeitos Congênitos Relacionados com o Álcool (DCRA), que se caracteriza principalmente por malformações físicas; c) Desordens Neurológicas Relacionadas com o Álcool (DNRA), abrangendo

principalmente deficiências neurocomportamentais; d) Síndrome Alcoólica Fetal parcial (pSAF), que inclui algumas, mas não todas as características diagnósticas de SAF (JONES *et al.*, 1973; JONES & SMITH., 1973; HELLEMANS *et al.*, 2010).

Figura 2 - Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal (TEAF). TEAF é um termo guarda-chuva que contempla os déficits causados por consumo de álcool materno.



Fonte: autoria própria.

Estima-se que o uso de qualquer tipo de bebida alcoólica durante a gestação seja em torno de 12% (FLOYD *et al.*, 2009) e que a incidência de TEAF afete cerca de 5% dos nascidos vivos por ano nos Estados Unidos da América (MAY *et al.*, 2009; CDC, 2014), e que sua forma mais grave (SAF) afete 1% deste total (CDC, 2014). No Brasil, estima-se que possam surgir entre 3.000 a 9.000 novos casos por ano de desordens relacionadas à EPA, com a prevalência de SAF atingindo em torno de 1:1000 nascidos vivos (GRINFELD *et al.*, 1999), podendo esses dados estarem bastante subestimados, devido às dificuldades diagnósticas e a não informação, por parte das mães, do possível consumo de bebidas alcoólicas nesse período (GARCIA *et al.*, 2007).

#### 1.4 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E OS TRANSTORNOS DO ESPECTRO ALCOÓLICO FETAL

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014) uma dose de álcool contém doze gramas de álcool puro e varia conforme o tipo de bebida, sendo que, de maneira geral, 330 ml de cerveja, 100 ml de vinho ou 30 ml de destilados contém a mesma porcentagem alcoólica

(12 g de álcool = 1 dose). Pesquisas indicam que um padrão de consumo pesado (5 ou mais doses em um único episódio), está associado ao desenvolvimento de SAF (CLARREN & SMITH, 1978; JONES & SMITH, 1973), enquanto outras mostram que mesmo um consumo considerado moderado (1 a 2 doses por dia) está, em alguns indivíduos, associado a déficits cognitivos e comportamentais, frequentemente revelados apenas em condições estressantes ou desafiadoras (STREISSGUTH *et al.*, 1999).

Ethen e colaboradores (2009) relataram que algumas mulheres grávidas se abstêm durante os dois primeiros trimestres da gravidez e começam a beber durante o terceiro trimestre, quando assumem de forma errônea que é seguro beber porque processos-chave de desenvolvimento estão completos. No entanto, os circuitos neuronais sofrem significativa diferenciação e refinamento durante esse período, o que pode torná-los particularmente suscetíveis aos efeitos do álcool (BACULIS *et al.*, 2015). Em pesquisas com animais, a exposição ao álcool de maneira restrita a algum dos períodos equivalentes ao desenvolvimento cerebral humano (1º, 2º ou 3º trimestre) mostrou ter consequências em longo prazo no encéfalo adulto por desregulação do seu estado redox (BROCARDO *et al.*, 2011). Mesmo um único episódio de exposição ao álcool, na janela temporal relacionada ao terceiro trimestre em humanos, com uma quantidade elevada de álcool (6 g/kg) leva a importantes perdas de células de Purkinje no cerebelo (LEE *et al.*, 2008); e com uma quantidade de 4,4 g/kg, pode levar a importantes perdas neuronais e microcefalia (LICONA *et al.*, 2009). Juntos estes dados suportam a afirmação de que não há um período seguro para se consumir álcool durante a gestação.

#### **1.4.1 Formação Hipocampal**

A formação hipocampal é uma região do encéfalo particularmente suscetível aos efeitos da exposição álcool durante o desenvolvimento. No terceiro trimestre gestacional ocorre um rápido crescimento cerebral, que inclui processos de mielinização, sinaptogênese e apoptose, e a exposição ao álcool nesse período pode levar a uma perda de células hipocampais (IKONOMIDOU *et al.*, 2000; MIKI *et al.*, 2000; KLINTSOVA *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que animais expostos ao álcool por apenas alguns dias durante este período podem apresentar efeitos deletérios na estrutura e função hipocampal (GUERRI, 1998; MIKI *et al.*, 2000), refletindo em prejuízos comportamentais dependentes do hipocampo, incluindo testes de aprendizagem e memória espacial (BERMAN & HANNIGAN, 2000; CHOI; ALLAN; CUNNINGHAM, 2005). A EPA também está associada com doenças psiquiátricas e vários estudos pré-clínicos tem demonstrado comportamentos semelhantes à ansiedade e à depressão,

os quais podem estar relacionados a danos estruturais e funcionais em regiões hipocampais (STREISSGUTH & O'MALLEY, 2000; O'CONNOR & PALEY, 2006; CALDWELL *et al.*, 2008; BROCARD *et al.*, 2012). Além disso, a exposição ao álcool durante o desenvolvimento pode levar a ativação imune no SNC, fator que pode contribuir com a neurodegeneração. Modelos animais de TEAF apresentaram níveis elevados de mRNA para fatores pró-inflamatórios como de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipocampo, cerebelo e córtex cerebral (DREW *et al.*, 2015).

O giro denteado no hipocampo está bastante relacionado com neuroplasticidade, sendo uma das poucas regiões conhecidas por ocorrer neurogênese no encéfalo adulto. A neuroplasticidade é definida como a capacidade de modificação e adaptação do SNC em função de suas experiências ou como tentativa de regeneração. Esta capacidade de adaptabilidade do encéfalo acontece devido às modificações nas circuitarias neurais existentes através da adição de novos neurônios ou pelo remodelamento das sinapses existentes (CHAKRABORTY *et al.*, 2007). Existem dois tipos de neuroplasticidade: a estrutural e a funcional ou sináptica. A plasticidade estrutural é caracterizada pelo processo de neurogênese adulta e por alterações numéricas e morfológicas dos espinhos dendríticos; e a plasticidade sináptica pelo fortalecimento, enfraquecimento e/ou remodelamento das sinapses existentes (CHAKRABORTY *et al.*, 2007).

A EPA altera a neuroplasticidade, tanto a neurogênese quanto a sinaptogênese, com efeitos que podem se perpetuar ao longo da vida do indivíduo (GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011; PATTEN *et al.*, 2013a; PATTEN *et al.*, 2013c). Algumas pesquisas com animais tem focado em alterações nas espinhas dendríticas após exposição ao álcool, mostrando um aumento na complexidade dendrítica apical em filhotes machos e fêmeas, o que pode indicar que a exposição ao álcool durante a desenvolvimento induz uma maturação prematura dos neurônios, levando à restrição precoce da plasticidade neuronal (GOEKE *et al.*, 2018). Outros trabalhos mostram que a diferenciação celular em neurônios imaturos parece estar aumentada nos animais expostos ao álcool *in utero*, o que pode estar relacionado a um mecanismo compensatório para neutralizar os efeitos deletérios do álcool nos estágios iniciais da maturação neuronal (GIL-MOHAPEL *et al.*, 2011).

Além disso, dados da literatura indicam que a EPA pode causar déficits de longa duração na plasticidade sináptica hipocampal (RICHARDSON *et al.*, 2002; CHRISTIE *et al.*, 2005; VARASCHIN *et al.*, 2010; BRADY *et al.*, 2013), incluindo redução na potenciação de longa duração (LTP) no giro denteado, tanto em animais adolescentes (TITTERNESS & CHRISTIE, 2012) quanto em adultos jovens (PATTEN *et al.*, 2013b; SICKMANN *et al.*, 2014) que foram



expostos ao álcool durante toda a gestação, sendo que o período equivalente ao 3º trimestre da gestação humana (que corresponde ao pico de crescimento encefálico) pode ser particularmente sensível aos efeitos do álcool, principalmente pelo aumento do estresse oxidativo (PATTEN, BROCARDO & CHRISTIE, 2013) e redução nos mecanismos antioxidantes endógenos (BROCARDO *et al.*, 2012; PATTEN; BROCARDO; CHRISTIE, 2013).

### 1.5 ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA

Mães que costumam consumir álcool tendem a ser menos atentas aos cuidados com seus filhos por muitos motivos, incluindo ausências durante crises de bebedeiras e prejuízos relacionados à amamentação. Desta forma, é importante ressaltar que os resultados são mais negativos na prole se o cuidado maternal adequado não for recebido durante os períodos perinatais críticos (KIM *et al.*, 2006; GERSHON *et al.*, 2013).

Além disso, muitas crianças nascidas com TEAF são criadas em condições precárias. No Canadá, crianças com histórico de EPA representam uma proporção significativa de indivíduos que entram em sistemas de cuidados infantis, como orfanatos (6 para cada 100 crianças) (LANGE *et al.*, 2013). Invariavelmente, elas enfrentam múltiplos estresses no início da vida, incluindo a SM. Embasados nessas evidências, modelos animais analisando transtornos do desenvolvimento envolvendo a interação entre EPA e estresse pós-natal tem sido explorados em diferentes idades, incluindo a adolescência (COMEAU; WINSTANLEY; WEINBERG, 2014), período em que alterações comportamentais e de humor podem se tornar mais evidentes nesses indivíduos.

Vários estudos têm demonstrado déficits comportamentais induzidos por SM sozinha, no entanto, poucas pesquisas combinaram SM com EPA. Swart e colaboradores (2018) utilizaram um modelo combinado de EPA com SM e mostraram que a SM *per se* aumenta a atividade exploratória em ratos adultos, quando comparado ao grupo controle, o que pode estar associado com hiperatividade nestes animais. No entanto, animais EPA combinados com SM não demonstraram essa mudança de comportamento. Outra pesquisa que utilizou apenas o modelo de SM sem expor os animais ao álcool, demonstrou que o estresse por SM desencadeou um comportamento tipo-depressivo em ratos adultos (60 dias de idade), mas não em idade correspondente a adolescência (animais com 30 dias de idade) (RÉUS *et al.*, 2017). Além disso, a SM está relacionada à diminuição da densidade sináptica no hipocampo de ratos adultos jovens (60 dias de idade) (ANDERSEN & TEICHER, 2004). Juntos, esses dados demonstram que o estresse por SM pode estar envolvido na modulação comportamental tanto em idades mais precoces e na vida adulta.

## 1.6 VITAMINA D

A vitamina D ou calciferol é uma molécula lipossolúvel derivada do colesterol, pertencente à família dos hormônios esteroides (DIXON & MASON, 2009). Em humanos existem duas formas precursoras de vitamina D, a vitamina D3 (colecalciferol) produzida na pele pela exposição ao sol ou por meio de alimentos e a vitamina D2 (ergosterol) obtida apenas pela alimentação (JONES, 2013). Nos seres humanos, apenas 10-20% da vitamina D necessária à adequada função do organismo provém da dieta, os demais 80-90% são sintetizados endogenamente (HOLICK, 2008). Em roedores a vitamina D é obtida apenas através da alimentação. No fígado, as vitaminas D2 e D3 são hidroxiladas em 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D], substância conhecida como calcidiol. Em seguida, essa molécula é transportada ao rim e outros tecidos, incluindo o SNC, cujas células contêm a enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1), uma proteína mitocondrial da família do CYP450 que promove hidroxilação no carbono 1 da 25(OH)D, convertendo-a no metabólito biologicamente ativo, conhecido como calcitriol ou 1,25-di-hidroxivitamina D3 [1,25 (OH) 2D3] (CHRISTAKOS *et al.*, 2007; CASTRO, 2011). As ações da vitamina D são classicamente mediadas pela ligação de seu metabólito ativo, 1,25 (OH) 2D3, ao receptor de vitamina D (VDR), levando à indução ou repressão de mais de 1000 genes em diferentes tecidos (EELLEN *et al.*, 2004).

A exposição ao álcool pode diminuir os níveis de vitamina D em humanos e animais (MANARI; PREEDY; PETERS, 2003; SANTORI *et al.*, 2008) incluindo gestantes (HOLLIS, 2007), assim, quantidades reduzidas de vitamina D podem contribuir para o TEAF (MILNE & BARAN, 1985; KEIVER; HERBERT; WEINBERG, 1996), sendo que a deficiência pré-natal de vitamina D produz efeitos semelhantes aos observados após a EPA (EYLES *et al.*, 2003; WILSON & CUDD, 2011). No entanto, mesmo na ausência de deficiência, a vitamina D apresenta propriedades neuroprotetoras, tais como a inibição da produção de óxido nítrico, reduzindo os níveis tóxicos de cálcio no encéfalo, reduzindo citocinas inflamatórias (HERSCOVITCH; DAULETBAEV; LANDS, 2014), aumentando a glutatona cerebral através de suas propriedades imunomoduladoras (MCGRATH *et al.*, 2001) e regulando positivamente os níveis de neurotrofinas, as quais acabam por aumentar a transmissão sináptica na formação hipocampal (KANG & SCHUMAN, 1995; BUELL & DAWSON-HUGHES, 2008; MCCANN & AMES, 2008).

Dados na literatura mostram que, em modelos animais, a vitamina D pode desempenhar um papel nos transtornos afetivos, por exemplo, atenuando os sintomas relacionados à depressão (DELUCA *et al.*, 2013; HOSSEIN-NEZHAD & HOLICK, 2013), uma vez que seus

receptores são expressos em regiões encefálicas associadas a transtornos depressivos, como por exemplo a formação hipocampal (LANGUB *et al.*, 2001; EYLES *et al.*, 2009). Neste sentido, em testes com animais, existem evidências de que a vitamina D pode ter uma ação tipo-antidepressiva (SPEDDING, 2014; CAMARGO *et al.*, 2018) e tipo ansiolítica (FEDOTOVA *et al.*, 2016). Além disso, outras pesquisas mostram que a suplementação com vitamina D é capaz de atenuar déficits cognitivos em diferentes modelos animais, regulando positivamente processos de memória e aprendizado (GUO *et al.*, 2019; HAJILUIAN *et al.*, 2018).

## 1.7 MODELO ANIMAL DE EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL DURANTE O NEURODESENVOLVIMENTO

O período gestacional de ratos é bem menor do que uma gravidez humana, variando entre 18 e 23 dias. Desta forma é relevante considerar que uma quantidade importante do desenvolvimento cerebral destes animais ocorre seguindo o nascimento. O desenvolvimento do cérebro de ratos pode ser dividido em frações equivalentes aos três trimestres da gestação humana: o período que corresponde ao 1º trimestre equivalente ocorre do dia gestacional (DG) 1 ao 10; o 2º trimestre equivalente compreende o DG 11 ao 20 e o 3º trimestre ocorre em período subsequente ao nascimento, do dia pós-natal (DPN) 1 ao 10, e é nesse período que ocorre o pico de crescimento do encéfalo com processos de maturação neuronal, mielinização e sinaptogênese (PATTEN *et al.*, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

O consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação está associado a graves alterações na estrutura e função do SNC, podendo resultar em alterações comportamentais importantes que, muitas vezes, só são percebidas em idade escolar. Investigar a associação de estresse e álcool durante o neurodesenvolvimento tem relevância clínica porque crianças de mães que ingeriram álcool durante a gravidez, além de todos os possíveis déficits decorrentes da exposição ao álcool *per se*, são mais propensas a sofrerem diferentes tipos de estresse ao longo da vida, especialmente o estresse de serem negligenciadas pelas próprias mães (STREISSGUTH & O'MALLEY, 2000; STREISSGUTH *et al.*, 2004).

Pesquisas com modelos animais trazem evidências de que a associação entre estresse no início da vida e exposição ao álcool durante o desenvolvimento pode levar a comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em ratos (NEGULESCO *et al.*, 1990; CARTWRIGHT & SMITH, 1995). Em humanos, estes transtornos podem gerar, além das dificuldades emocionais,

um grande impacto financeiro sobre a pessoa afetada, seus familiares e aos cofres públicos, refletindo como um sério problema de saúde pública.

Atualmente não existem tratamentos que possam propiciar a cura para TEAF e a melhor estratégia seria não consumir bebidas alcoólicas durante a gestação. Neste sentido, sabendo-se de todas as consequências ocasionadas pelo consumo de bebidas alcoólicas durante o desenvolvimento, é de grande importância o conhecimento de possíveis recursos terapêuticos, por exemplo, a suplementação vitamínica, que visam aliviar estes efeitos deletérios e melhorar a qualidade de vida dos sujeitos acometidos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial terapêutico da vitamina D3 em modular alterações comportamentais em ratos (machos e fêmeas) expostos ao álcool e ao estresse da SM durante o desenvolvimento do SNC.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar o efeito da administração de vitamina D3 em um modelo animal de exposição ao álcool durante o desenvolvimento com agravante de estresse no início da vida, induzido por um modelo de SM durante o período de amamentação:

- 1) Na atividade locomotora através do teste do campo aberto;
- 2) No comportamento tipo-ansiedade através do teste do campo aberto e da análise do comportamento de autolimpeza;
- 3) No comportamento tipo-depressivo através do teste do nado forçado.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 ANIMAIS**

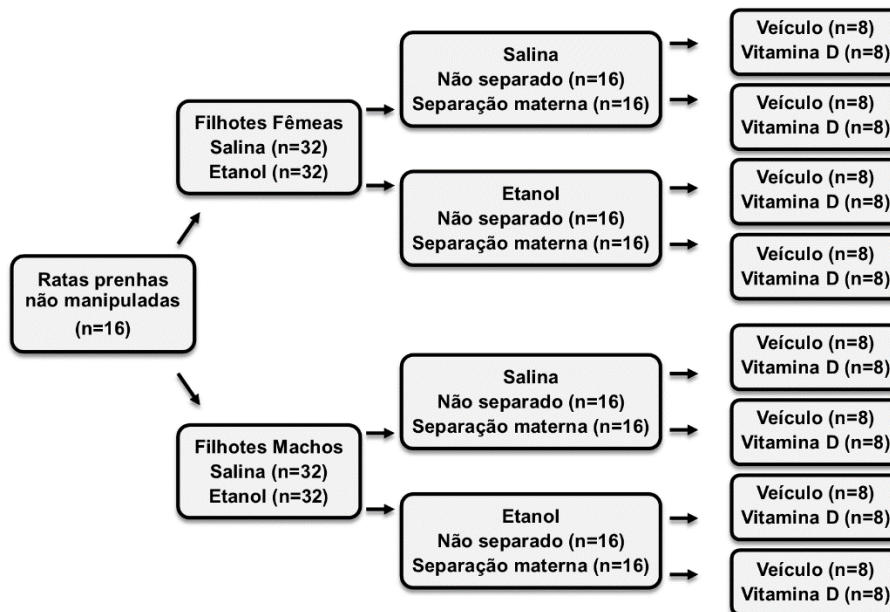
Foram utilizados 128 animais (64 machos e 64 fêmeas), provenientes de 16 ratas Wistar prenhas fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. As ratas prenhas foram mantidas em duplas até o dia gestacional 18, quando foram alojadas individualmente. O dia do nascimento foi considerado o dia pós-natal zero (DPN0). No DPN2, as ninhadas foram mantidas com número máximo de 10 filhotes por mãe (5 machos e 5 fêmeas, sempre que possível). No DPN 21, os animais foram desmamados e separados por sexo. Todos os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFSC, em caixas plásticas opacas (41 X 34 X 16

cm), em temperatura de 20-22°C, com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12h (07:00-19:00h). Todas as manipulações foram realizadas entre 9h e 17h. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) - Protocolo 6980201116, e ocorreram sob orientação da médica veterinária do Centro de Ciências Biológicas da UFSC (CCB/UFSC). Todos os esforços foram realizados para minimizar ou evitar o sofrimento dos animais.

#### 4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

No DPN2, os filhotes de cada ninhada foram separados em machos (M) e fêmeas (F) e distribuídos em 8 diferentes grupos para cada sexo, com o número de 8 animais por grupo (n=8), conforme a condição (5g/kg/dia de EtOH 25% v/v em salina, ou a mesma quantidade de veículo salina), estresse (SM ou não separado) e tratamento [1000 UI/dia de vitamina D3 (colecalfiferol, precursor do metabólito ativo), ou veículo óleo mineral]. A distribuição dos grupos se deu da seguinte forma: salina, não separado, veículo (Sal/nSM/Vei); salina, não separado, vitamina D (Sal/nSM/VitD); salina, SM, veículo (Sal/SM/Vei); salina, SM, vitamina D (Sal/SM/VitD); etanol, não separado, veículo (EtOH/nSM/Vei); etanol, não separado, vitamina D (EtOH/nSM/VitD); etanol, SM, veículo (EtOH/SM/Vei); etanol, SM, vitamina D (EtOH/SM/VitD), totalizando 16 grupos, como ilustrado na Figura 3.

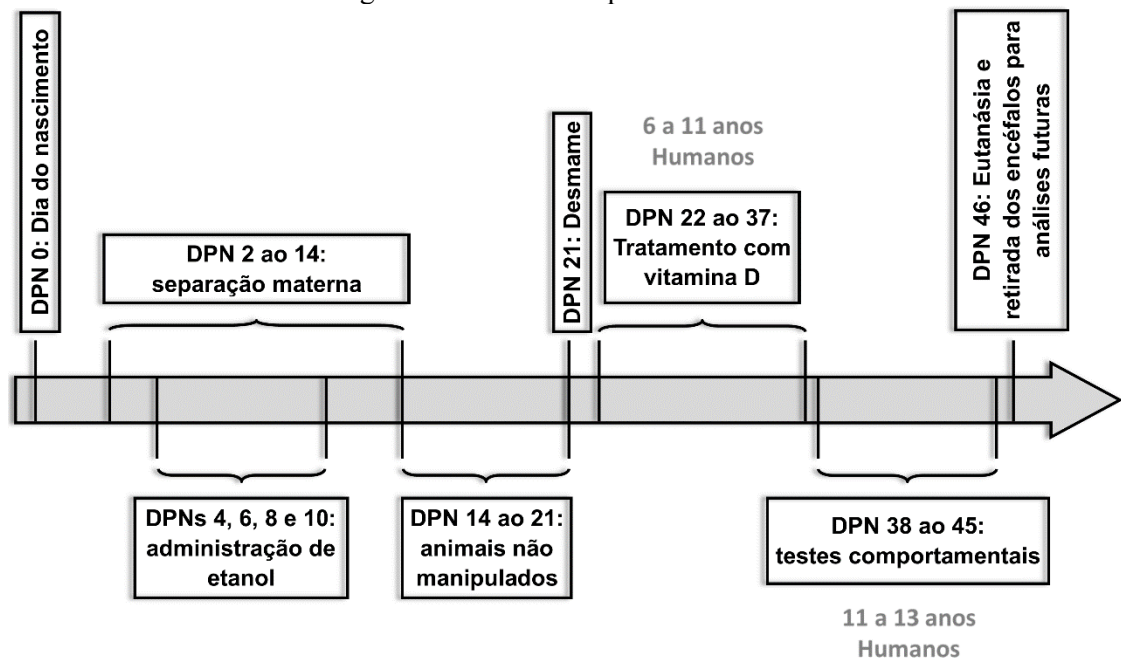
Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais.



No DPN2 os animais foram distribuídos em dezesseis diferentes grupos experimentais (n=8), sendo oito grupos de machos e oito de fêmeas e organizados conforme a condição (EtOH ou salina), o estresse (SM ou não separado) e o tratamento (Vitamina D ou veículo). Fonte: autoria própria.

O protocolo experimental foi realizado conforme a linha do tempo representada na Figura 4. O dia do nascimento foi considerado o DPN0. O protocolo de SM iniciou no DPN2 e finalizou no DPN14 (3 horas diárias). A administração de EtOH ocorreu pontualmente nos DPNs 4, 6, 8 e 10. Aos 21 dias de idade os animais foram desmamados. O tratamento com vitamina D ou veículo iniciou no DPN22 e finalizou no DPN37, em humanos esta janela temporal corresponde ao período da infância (entre 6 e 11 anos) (SENGUPTA, 2013). Os testes comportamentais foram realizados entre os DPNs 38 e 45, período correspondente ao início da adolescência em humanos (11 a 13 anos) (SENGUPTA, 2013). No DPN 46 os animais foram eutanasiados por perfusão cardíaca com paraformaldeído 4% e os encéfalos coletados para futuras análises.

Figura 4 - Protocolo experimental.



DPN, dia pós-natal. Fonte: autoria própria.

#### 4.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO AO ÁLCOOL DURANTE O DESENVOLVIMENTO

A exposição ao álcool foi realizada na janela temporal que corresponde ao 3º trimestre da gestação humana, seguindo um protocolo proposto por Filgueiras e colaboradores (2010). Nos DPNs 4, 6, 8 e 10, os filhotes dos grupos EtOH foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 5g/Kg/dia de álcool (25% em solução salina). Um volume equivalente de solução salina foi injetado (i.p.) nos filhotes dos grupos Salina. A administração foi realizada em dias alternados para evitar a mortalidade de animais, uma vez que esta dosagem mimetiza o consumo excessivo em humanos, alcançando uma concentração de álcool sanguíneo (CAS) em torno 239 mg/dl

após uma hora da administração (FILGUEIRAS; KRAHE; MEDINA, 2010) e está associado a déficits cognitivos e comportamentais graves (MAIER & WEST, 2001; MEDINA *et al.*, 2003; MEDINA; KRAHE & RAMOA, 2005).

#### 4.4 PROTOCOLO DE ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA POR SEPARAÇÃO MATERNA

O modelo que visa mimetizar um estresse no início da vida por meio da SM foi realizado conforme descrito por Swart, Russel e Dimatelis (2018). As ninhadas inteiras foram escolhidas aleatoriamente para serem submetidas à SM do DPN2 ao DPN14 por 3h/dia (09h-12h), enquanto as ninhadas de controle permaneceram com suas mães. Os filhotes foram cuidadosamente removidos de sua gaiola e colocados em uma gaiola limpa separada. As ninhadas foram levadas para uma sala separada a fim de evitar a comunicação entre os filhotes e a mãe por vocalizações ultrassônicas. Durante o período de separação, o ambiente onde ficaram alojados os filhotes, foi mantido com temperatura de  $\pm 25^{\circ}$  C. Após 3 h, os filhotes foram devolvidos à mãe em sua gaiola original.

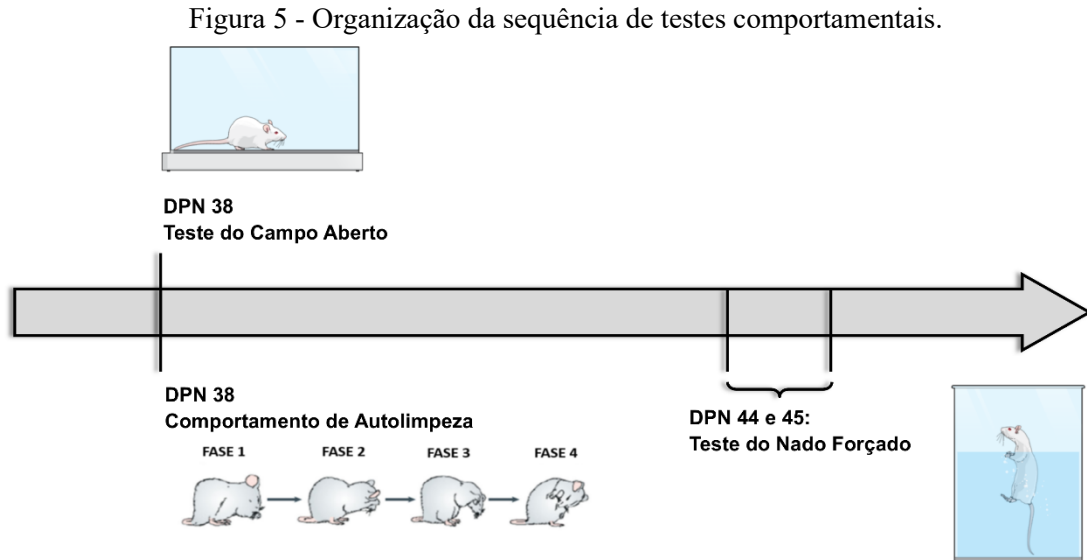
#### 4.5 TRATAMENTO COM VITAMINA D

Entre os DPNs 22 e 37, os animais foram tratados com 1,000 unidades internacionais (UI)/kg/dia/i.p. de vitamina D3 (colecalfiferol) (Webber Naturals Pharmaceuticals), forma precursora do metabólito biologicamente ativo, 1,25-di-hidroxitamina D3. Os grupos de controle receberam veículo (óleo mineral 100% Purulim - Lifar). A escolha da dose foi baseada na pesquisa de Liang e colaboradores (2018), que classificam como dose padrão, enquanto valores elevados (ex: 10,000 U.I.) é considerado como overdose. Este período da vida em ratos (DPN 22-37) corresponde à infância tardia em humanos, idade equivalente entre 6 e 11 anos (SENGUPTA, 2013). Sabe-se que EPA pode diminuir os níveis de vitamina D, tanto em humanos quanto em animais (IDRUS *et al.*, 2013). Além disso, crianças com atrasos neurológicos têm um risco aumentado de deficiência de vitamina D (PENAGINI *et al.*, 2017).

#### 4.6 PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS

Do DPN38 ao DPN45 (período da adolescência), os animais passaram por diferentes testes comportamentais, visando investigar os efeitos do tratamento com vitamina D3 administrada na infância, em distintos transtornos que podem estar presentes após indução do modelo de EPA somado ao modelo de estresse precoce por SM, tais como: hiperatividade, comportamento tipo-ansioso, frustração por omissão de um reforço e comportamento tipo-depressivo. Para organização da sequência de avaliações comportamentais foi levada em

consideração a aversividade de cada atividade, realizando os testes na ordem do menos aversivo para o mais aversivo, conforme representado na Figura 5.



Os testes foram realizados na sequência do menos aversivo para o mais aversivo. No dia pós-natal (DPN) 38 foi realizado o teste do campo aberto, seguido pela avaliação do comportamento de autolimpeza. Entre os dias 40 e 42 foi realizado o comportamento de frustração através de uma análise etológica por omissão de reforço. Nos dias 44 e 45 foram realizados o treino e o teste do nado forçado. Fonte: autoria própria.

Todos os testes foram realizados no ciclo claro em uma sala de observação atenuada por som e sob luz de baixa intensidade (12 lux) (exceto comportamento de frustração). Os ratos foram habituados por pelo menos 1 hora antes do início dos experimentos. Todos os testes comportamentais foram filmados e analisados posteriormente pelo mesmo avaliador e de forma cega.

#### 4.6.1 Teste do campo aberto

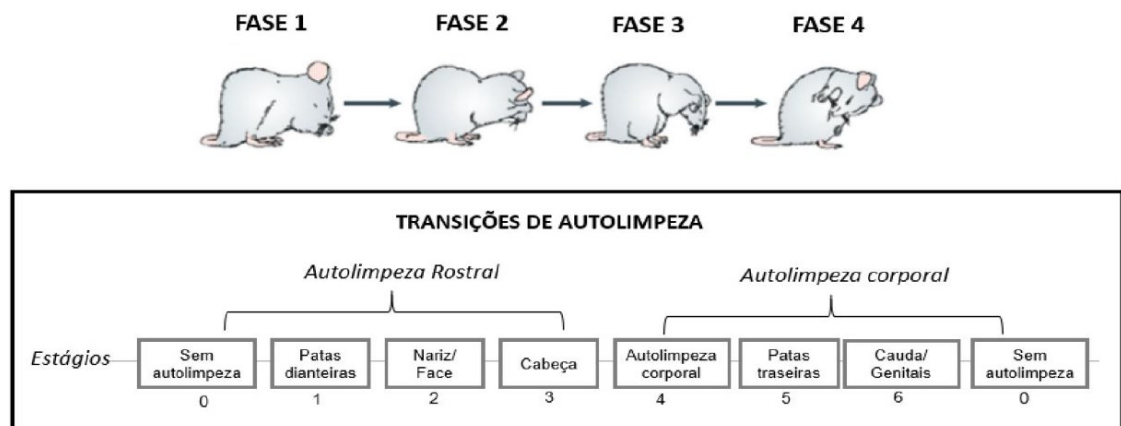
O teste do campo aberto foi realizado para avaliação da atividade locomotora espontânea e do comportamento tipo-ansioso. Os ratos foram colocados no centro de uma arena de madeira (100 × 100 cm, paredes cinza e piso cinza) e exploraram livremente durante 6 minutos. A distância total percorrida, a velocidade média e o tempo total de mobilidade foram registrados como indicadores da atividade locomotora espontânea. O tempo gasto no centro (30 x 30 cm) e o tempo gasto nos cantos (quatro cantos de 10 x 10 cm) do campo aberto foram usados como uma medida do comportamento semelhante à ansiedade (WALSH & CUMMINS, 1976). Os testes foram filmados e analisados através do software Any-maze (Stoelting, EUA- versão 4.99m).



#### 4.6.2 Comportamento de autolimpeza

A autolimpeza nos animais é um comportamento inato envolvido com a manutenção de higiene entre outros processos fisiológicos importantes. A autolimpeza é um dos comportamentos mais frequentes observados em roedores e possui uma organização sequencial padronizada, com progressão cefalocaudal característica, que consiste em movimentos estereotipados conhecidos como cadeias sintáticas (KALUEFF *et al.*, 2007; SONG, BERRIDGE & KALUEFF, 2016) (Figura 6). Roedores com fenótipo ansioso tendem a aumentar a quantidade de vezes que realizam a autolimpeza, bem como tendem a aumentar o tempo realizando esse comportamento (PLESKACHEVA, 1996; KALUEFF & TUOHIMAA, 2004; WANG *et al.*, 2017). Além disso, medicamentos ansiolíticos tendem a diminuir a frequência e os padrões desorganizados de autolimpeza (KALUEFF & TUOHIMAA, 2004; NIN *et al.*, 2012), sugerindo que a avaliação da sequência dos padrões de autolimpeza é um importante parâmetro a ser utilizado para avaliar o estresse e a ansiedade em modelos animais. Nessa pesquisa foram analisadas a latência para iniciar a autolimpeza e o tempo total da autolimpeza. A fim de investigar a distribuição regional do comportamento de autolimpeza, a autolimpeza rostral e corporal também foram analisadas neste estudo (KALUEFF & TUOHIMAA, 2004; KOMOROWSKA & PELLIS, 2004). A autolimpeza rostral inclui a limpeza das patas dianteiras, nariz, face, orelhas e cabeça. A autolimpeza corporal inclui a autolimpeza das patas traseiras, cauda e genitais.

Figura 6 - Imagem representativa da organização sequencial do comportamento de autolimpeza, padronizada pelo grupo de pesquisa de Alan Kalueff.



Fonte: modificado de KALUEFF *et al.*, (2016).

O teste se organiza da seguinte forma: inicialmente o rato será colocado no aparato do campo aberto por 6 minutos, considerado um ambiente novo e aversivo/estressor. Imediatamente após essa exposição, cada animal será colocado separadamente em um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro; 40 cm de altura), onde seu comportamento será filmado pelo tempo de 5 minutos (KALUEFF & TUOHIMAA, 2004; 2005) e as análises contabilizadas manualmente.

#### **4.6.3 Teste do nado forçado**

O comportamento do tipo depressivo foi avaliado no teste do nado forçado, conforme descrito anteriormente (Porsolt *et al.*, 1977). Resumidamente, os animais foram colocados individualmente em cilindros de natação de plástico (60 cm de altura x 25 cm de diâmetro) contendo água limpa a  $24 \pm 1$  ° C (45 cm de profundidade) por 15 minutos (pré-teste). Vinte e quatro horas após o pré-teste, os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min e o tempo de imobilidade foi registrado manualmente. A imobilidade foi definida como a falta de movimento do corpo inteiro, consistindo apenas de pequenos movimentos necessários para manter a cabeça do animal acima da água.

#### **4.7 EUTANÁSIA**

Aos 45 dias de idade, os animais foram anestesiados i.p. com cetamina (100 mg/Kg.) e xilazina (10 mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído (PFA) 4%. Os encéfalos foram removidos da calota craniana e armazenados adequadamente para futuras análises imuno-histoquímicas para proliferação e diferenciação celular, bem como para avaliação da arborização dendrítica através da técnica de Golgi.

#### **4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para verificar a existência de outliers foi utilizado o teste de Grubbs. Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Todas as variáveis se apresentaram com distribuição normal. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas (peso da prole) ou ANOVA multifatorial (testes comportamentais), seguido pelo teste post-hoc de Duncan, quando apropriado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, sendo que um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MASSA CORPORAL DA PROLE

#### 5.1.1 Massa corporal da prole antes do desmame

A massa corporal da prole foi determinada durante o período de lactação nos DPNs 2, 6, 10 e 21.

Conforme apresentado na Tabela 1, todos os filhotes ganharam peso durante o período de amamentação. Foram observadas diferenças significativas entre os sexos em todos os dias avaliados [F (4, 117)=13,060, p=0,00], onde a massa corporal das fêmeas foi reduzida em comparação com suas contrapartes masculinas. A partir das diferenças observadas entre os sexos, os grupos de machos e fêmeas foram avaliados separadamente a fim de verificar possíveis efeitos da condição (EtOH ou salina), do estresse (separado ou não separado maternalmente) e interações entre os mesmos.

Tabela 1 - Efeito da exposição ao álcool e estresse por SM na massa corporal (g) da prole.

Grupo	DPN2	DPN6	DPN10	DPN21
<i>Fêmeas</i>				
Sal/nSM	6,9±0,2**	12,0±0,3	18,3±0,5	40,3±1,0
Sal/SM	6,9±0,2	11,2±0,3 <sup>#</sup>	16,4±0,6 <sup>#</sup>	36,7±1,1 <sup>#</sup>
EtOH/nSM	6,5±0,1**	10,9±0,3** <sup>###</sup>	16,4±0,4** <sup>#</sup>	37,9±1,3*
EtOH/SM	6,9±0,2**	11,5±0,2**	18,2±0,8** <sup>&amp;</sup>	39,0±0,5*
<i>Machos</i>				
Sal/nSM	8,0±0,3	12,8±0,2	19,0±0,6	41,1±1,3
Sal/SM	7,4±0,2	11,6±0,4	16,7±0,6	38,8±1,3
EtOH/nSM	7,8±0,2	12,8±0,3	19,0±0,4	42,2±1,2
EtOH/SM	7,8±0,3	12,9±0,3	21,0±1,0	42,8±0,7

As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo post-hoc teste Duncan. Os valores estão expressos em média ± E.P.M. (16 animais/grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01 quando comparados com sua contraparte masculina. <sup>#</sup>p<0,05 versus F/Sal/nSM/; <sup>###</sup>p<0,01 versus F/Sal/nSM; <sup>&</sup>p<0,05 versus Sal/SM. DPN, dia pós-natal; EPA, exposição pré-natal ao álcool; EtOH, EtOH; nSM, não separado maternalmente; Sal, salina; SM, SM.

Dentre os grupos de fêmeas, foram observados importantes efeitos da condição, do estresse e da interação condição-estresse {condição [F(4, 57)=3,7010, p=0,009], estresse [F(4, 57)=3,4397, p=0,014], condição-estresse [F(4, 57)=8,7830, p=0,00001]}. Conforme apresentado na Tabela 1, não foram identificadas diferenças entre os grupos no DPN2, o que já era esperado, considerando que neste dia os animais iniciariam o protocolo de SM e não tinham sofrido nenhuma intervenção. No DPN6, tanto a exposição ao EtOH, quanto o estresse por SM resultaram em diminuição da massa corporal da prole quando comparada com sua contraparte

controle [EtOH/nSM *versus* Sal/nSM ( $p<0,01$ ); Sal/SM *versus* Sal/nSM ( $p<0,05$ )]. No entanto, esta diferença não foi observada entre os grupos expostos aos dois protocolos (EtOH+SM). No DPN10 resultado semelhante foi observado, onde, novamente, tanto a exposição ao EtOH, quanto ao estresse por SM resultaram em diminuição da massa corporal da prole quando comparada com sua contraparte controle [EtOH/nSM *versus* Sal/nSM ( $p<0,05$ ); Sal/SM *versus* Sal/nSM ( $p<0,05$ )]. Além disso, interessante, os animais do grupo combinado (EtOH+SM) tiveram a massa corporal aumentada em comparação com o grupo que sofreu apenas estresse por SM, sem exposição ao EtOH [EtOH/SM *versus* Sal/SM ( $p<0,05$ )], sugerindo algum tipo de compensação quando ocorre exposição conjunta a duas situações adversas no início da vida. No DPN21, observou-se apenas efeito do protocolo de estresse, onde os animais do grupo controle salina que foram separados matematicamente apresentaram menor massa corporal do que sua contraparte não separada [Sal/SM *versus* Sal/nSM ( $p<0,05$ )].

Com relação aos grupos de machos, não foram observados efeitos da condição, do estresse ou da interação condição-estresse sobre a massa corporal da prole no período de amamentação {condição [F(4, 57)=2,4550,  $p=0,06$ ], estresse [F(4, 57)=1,8588,  $p=0,13$ ], condição-estresse [F(4, 57)=2,3800,  $p=0,06$ ]}.

### 5.1.2 Massa corporal da prole ao longo do tratamento com vitamina D ou veículo

Todos os animais tiveram aumento da massa corporal durante esse período. Foram observados importantes efeitos do sexo [F(3, 110)=138,70,  $p=0,0000$ ] (Tabela 2). No DPN30, as fêmeas expostas ao EtOH, sujeitas ao protocolo de estresse por SM e tratadas com veículo, apresentaram menor massa corporal em comparação com sua contraparte masculina—( $p<0,05$ ). Estas diferenças não foram observadas nos grupos tratados com vitamina D. Além disso, as fêmeas do grupo EtOH não separadas, independentemente do tratamento, tiveram menor massa corporal que suas contrapartes masculinas, ( $p<0,01$ ). Ainda, as fêmeas do grupo controle salina que foram expostas ao protocolo de SM e tratadas com veículo, estavam com menor massa corporal comparando com sua contraparte masculina [F/Sal/SM/Vei *versus* M/Sal/SM/Vei ( $p<0,05$ )] e esta diferença não foi observada entre os grupos tratados com vitamina D. No DPN45, todos os grupos de fêmeas apresentaram menor massa corporal em comparação com suas contrapartes masculinas ( $p<0,001$ ). A partir das diferenças observadas entre os sexos, os grupos de machos e fêmeas foram avaliados separadamente a fim de verificar possíveis efeitos da condição (EtOH ou salina), do estresse (separado ou não separado matematicamente), do tratamento (vitamina D ou veículo) e interações entre os mesmos.

Tabela 2 - Efeito de EPA, estresse por SM e tratamento com vitamina D no peso da prole após o período de amamentação.

Grupo	Tratamento	Peso PND21	Peso PND30	Peso PND45
<i>Fêmeas</i>				
Sal/nSM	Veículo	37,8±1,0	73,6±1,8	144,8±3,9**
	Vitamina D	41,6±1,5	82,0±2,0 <sup>&amp;</sup>	149,9±2,6**
Sal/SM	Veículo	37,6±1,6	74,0±2,5*	140,8±3,8**
	Vitamina D	39,6±1,8	77,4±3,8	144,6±4,5**
EtOH/nSM	Veículo	37,4±1,7	70,4±1,1**	146,5±3,7**
	Vitamina D	38,5±2,1 <sup>#</sup>	70,5±2,0*** <sup>#</sup>	144,8±4,8**
EtOH/SM	Veículo	39,0±0,3	75,9±1,8*	147,9±2,5**
	Vitamina D	39,0±1,0 <sup>#</sup>	74,9±1,0	146,0±1,5**
<i>Machos</i>				
Sal/nSM	Veículo	40,3±1,0	81,3±3,0	190,9±8,3
	Vitamina D	42,4±1,0	86,3±2,3	195,4±5,1
Sal/SM	Veículo	40,9±1,5	84,0±3,8	181,8±7,4
	Vitamina D	42,0±1,9	84,6±4,0	180,3±5,5
EtOH/nSM	Veículo	41,9±2,0	84,6±4,5	189,3±4,9
	Vitamina D	42,1±1,5	82,9±2,5	185,9±3,5
EtOH/SM	Veículo	42,5±1,2	85,0±2,0	190,4±4,0
	Vitamina D	43,0±0,6	83,4±1,0	187,6±2,7

As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste Duncan. Os valores estão expressos em média ± E.P.M. (8 animais/grupo). \*p<0,05; \*\*p<0,01 quando comparados com sua contraparte masculina. <sup>#</sup>p<0,05 e <sup>##</sup>p<0,01 versus Sal/nSM/VitD; <sup>&</sup>p<0,05 versus Sal/nSM/Vei. EPA, exposição pré-natal ao álcool; EtOH, EtOH; nSM, não separado maternamente; Sal, salina; SM, SM.

Dentre os grupos de fêmeas, foram observados efeitos da condição e do tratamento {condição [F(3, 54)=5,6581, p=0,002], tratamento [F(3, 54)=2,7902, p=0,049]}. No DPN21, os grupos expostos ao EtOH, independentemente do estresse por SM, e que iniciariam tratamento com vitamina D, estavam com menor massa corporal do que o grupo controle salina não separado que iniciaria o mesmo tratamento, p<0,05). Como neste dia nenhum dos grupos havia iniciado a intervenção farmacológica, infere-se que estas diferenças se devam ao protocolo de exposição ao EtOH, considerando que os resultados foram observados tanto no grupo separado, quanto no não separado maternamente. No entanto, esta característica não se repetiu nos grupos que iniciariam tratamento com controle veículo. No DPN30, o grupo EtOH, não exposto ao estresse por SM e tratado com vitamina D, teve menor massa corporal em comparação com o grupo controle salina não separado tratado com vitamina D (p<0,01). Estas diferenças não foram observadas nos grupos tratados com veículo. Além disso, o grupo controle salina não separado e tratado com vitamina D, apresentou maior massa corporal do que sua contraparte tratada com veículo (p<0,05). Neste sentido, parece que a vitamina D *per se* modula positivamente o ganho de peso, no entanto, ratos expostos ao EtOH e tratados com vitamina D estavam menores do que sua contraparte controle, sugerindo que o EtOH *per se* modula

negativamente o ganho de massa corporal e a vitamina D não é capaz de reverter esse efeito. Por fim, no PND45, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. Considerando que nesta data já havia encerrado o tratamento com vitamina D, estima-se que seus efeitos modulatórios relacionados no aumento de massa corporal ocorram de forma aguda e concomitante ao tratamento, não tendo efeitos em longo prazo. Da mesma forma, os feitos anteriormente observados do EtOH, modulando negativamente o ganho de massa corporal nos animais expostos, não foi observado nesta idade. Infere-se que, ao longo do desenvolvimento, mecanismos compensatórios sejam ativados e possibilitem a normalização da massa corporal em comparação com os grupos não expostos ao EtOH.

Com relação a massa corporal nos grupos de machos, não foram revelados efeitos significativos da condição e do tratamento ou da interação entre eles {condição [F(3, 54)=0,81849, p=0,49], estresse [F(3, 54)=1,4519, p=0,24], tratamento [F(3, 54)=0,63948, p=0,59], condição-estresse [F(3, 54)=1,7815, p=0,16], condição-tratamento [F(3, 54)=0,35702, p=0,78], estresse-tratamento [F(3, 54)=0,10116, p=0,96], condição-estresse-tratamento [F(3, 54)=0,09491, p=0,96]}.

## 5.2 TESTE DO CAMPO ABERTO

### 5.2.1 Atividade locomotora

Diferenças significativas foram observadas entre os sexos em todos os parâmetros relacionados à atividade locomotora {distância total percorrida [F(1,112)=22,156, p<0,001], velocidade média [F(1,112)= 22,017, p<0,001], tempo total de mobilidade [F(1,112)=13,183, p<0,001]}. Com relação à distância total percorrida, as fêmeas dos grupos que receberam EtOH e não sofreram estresse por SM percorrem uma distância maior comparado com sua contraparte masculina, independentemente do tratamento: (\*p<0,05 grupo veículo); (\*\*p<0,01 grupo vitamina D). Além disso, as fêmeas do grupo controle salina que sofreram estresse por SM percorrem maior distância do que sua contraparte masculina, no entanto, este resultado foi observado apenas nos grupos tratados com vitamina D (\*p<0,05). Relacionado com o parâmetro velocidade média, as fêmeas do grupo EtOH não separado maternamente apresentaram maior velocidade média do que sua contraparte masculina, este resultado foi observado apenas no grupo tratado com veículo e não com vitamina D (\*p<0,05). Ainda, o grupo das fêmeas que sofreram estresse por SM e não foram expostas ao EtOH tiveram maior velocidade média do que sua contraparte masculina, no entanto, este resultado foi observado

apenas no grupo tratado com vitamina D e não no controle veículo (\* $p < 0,05$ ). No parâmetro tempo de mobilidade, foram observadas diferenças entre os sexos apenas nos grupos que receberam tratamento com vitamina D, as fêmeas do grupo EtOH não separado (\*\* $p < 0,01$ ) e as fêmeas do grupo controle salina com estresse por SM (\* $p < 0,05$ ) tiveram maior tempo de mobilidade em comparação com suas contrapartes masculinas. A partir das diferenças observadas entre os sexos, os grupos de machos e fêmeas foram avaliados separadamente a fim de verificar possíveis efeitos da condição (EtOH ou salina), do estresse (separado ou não separado maternamente) ou do tratamento (vitamina D ou veículo) e interações entre os mesmos.

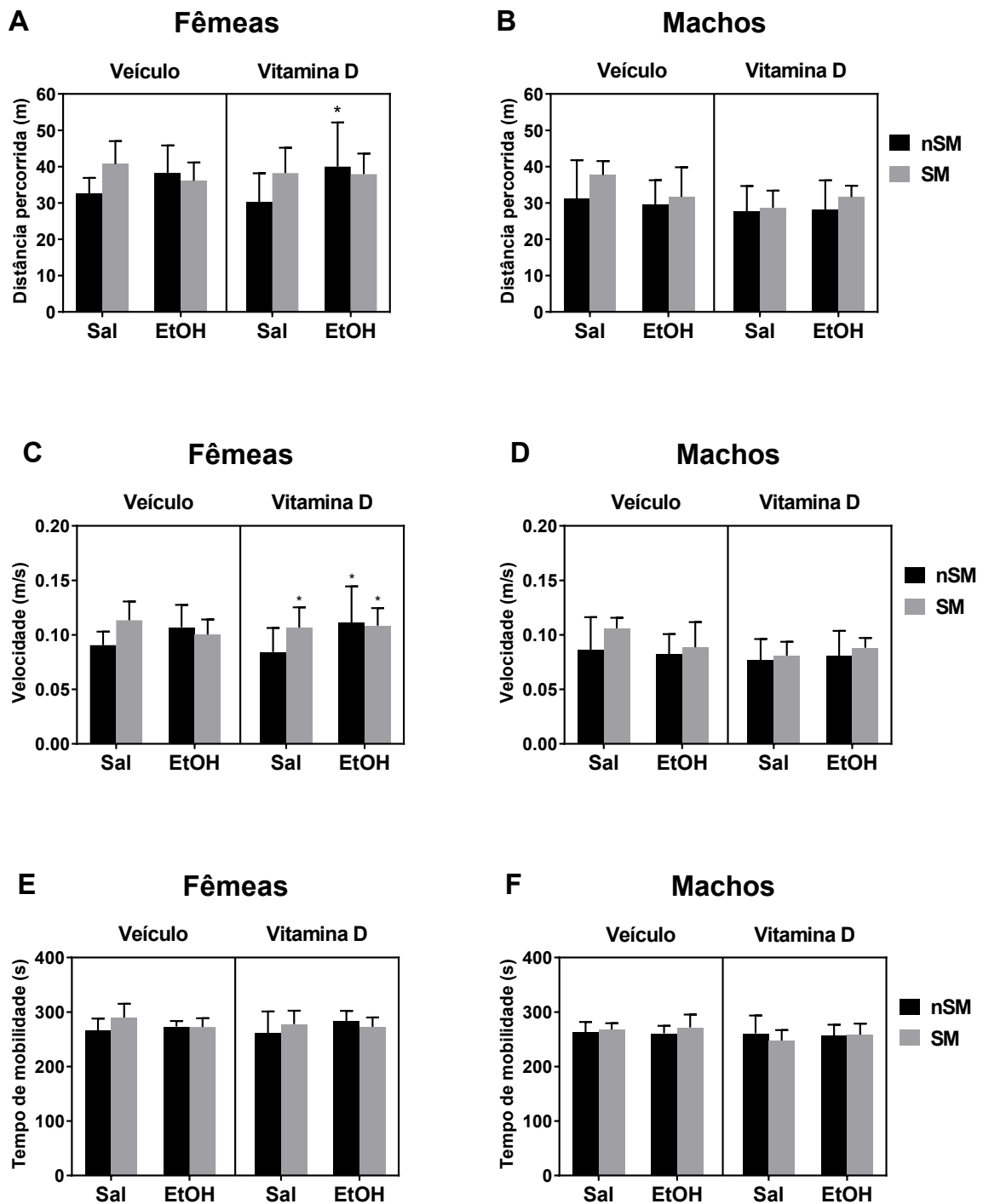
Dentre as fêmeas, foi observado um efeito significativo na interação condição-estresse [ $F(1, 56) = 7,5806$ ,  $p < 0,01$ ] no parâmetro distância total percorrida. Conforme representado na figura 7A, as fêmeas EtOH não separadas tratadas com vitamina D percorrem maior distância quando comparadas com as fêmeas do grupo controle salina, não separadas e tratadas com vitamina D ( $p < 0,05$ ). No entanto, estas diferenças não foram observadas nos grupos expostos ao protocolo de SM ou nos animais tratados com o controle veículo.

Na velocidade média (Figura 7C), também em fêmeas, houve um efeito significativo da interação condição-estresse [ $F(1, 56) = 7,3336$ ,  $p < 0,01$ ], onde o grupo apenas EtOH ou apenas SM, bem como o grupo combinado de EtOH e SM, apresentaram maior velocidade média em comparação com o grupo controle salina ( $p < 0,05$ ). Importante ressaltar que estes resultados estão presentes apenas nos grupos tratados com vitamina D e não nos animais que receberam veículo.

Ainda dentre as fêmeas, no quesito tempo total de mobilidade (Figura 7E), observou-se um efeito significativo da interação condição-estresse [ $F(1, 56) = 4,9689$ ,  $p < 0,05$ ], no entanto, o teste *post-hoc* não revelou diferenças importantes entre cada grupo em comparação com sua contraparte controle.

Nos grupos de machos (Figuras 7B, 7D e 7F), não foram reveladas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 7 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM na atividade locomotora em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste do campo aberto (n=8).



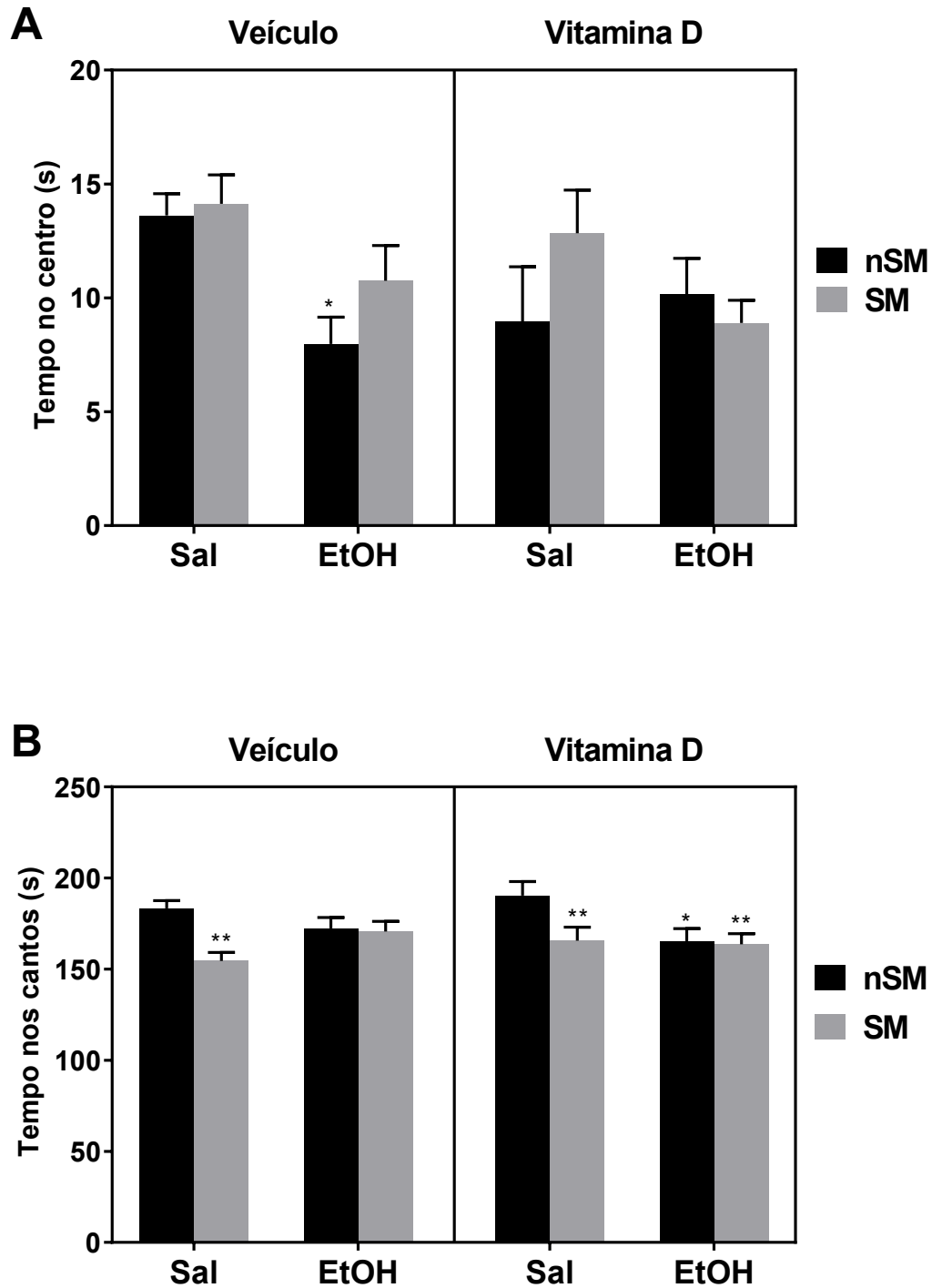
As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA multifatorial, seguida pelo teste Duncan. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (8 animais/grupo). Distância total percorrida em fêmeas (A). Distância total percorrida em machos (B). Velocidade média em fêmeas (C). Velocidade média em machos (D). Tempo total de mobilidade em fêmeas (E). Tempo total de mobilidade em machos (F). \* $p < 0,05$  versus F/Sal/nSM/VitD.



### **5.2.2 Comportamento tipo-ansioso**

Com relação aos parâmetros que se referem aos comportamentos semelhantes à ansiedade, não foram reveladas diferenças significativas entre os sexos em nenhuma variável analisada {tempo no centro [ $F(1, 107)=,02993$ ,  $p=0,86$ ; tempo nos cantos [ $F(1, 112)=1,1932$ ,  $p=0,28$ ]}. Como não foram obtidas diferenças entre os sexos, os dados de machos e fêmeas foram agrupados ( $n=15-16$  animais/grupo).

Figura 8 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansioso em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste do campo aberto.



As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA multifatorial, seguida pelo teste de Duncan. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (15-16 animais/grupo). Tempo no centro em segundos (A). Tempo nos cantos em segundos (B). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparados com o grupo controle salina não separado.

No parâmetro tempo no centro (Figura 8A), foi encontrado um importante efeito da condição [ $F(1, 115)=7,2342, p<0,01$ ]. O grupo EtOH/nSM/Veículo ficou menos tempo no centro quando comparado com o grupo controle Sal/nSM/Veículo ( $p<0,05$ ). Além disso, o grupo exposto ao EtOH e não separado maternalmente que foi tratado com vitamina D não diferiu do controle, sugerindo um efeito positivo do tratamento com vitamina D na modulação do comportamento tipo-ansioso.

No parâmetro tempo nos cantos (Figura 8B), houve um efeito significativo do estresse [ $F(1, 120)=10,980, p<0,01$ ] e da interação condição-estresse [ $F(1, 120)=8,4725, p<0,01$ ]. Os grupos que receberam salina e sofreram estresse por SM, permaneceram menos tempo nos cantos em comparação com sua contraparte não separada maternalmente, independente do tratamento com vitamina D (\*\* $p<0,01$ ) ou veículo (\*\* $p<0,01$ ). Além disso, o grupo exposto ao EtOH não separado maternalmente que foi tratado com vitamina D ficou menos tempo nos cantos quando comparado com o grupo controle salina [EtOH/nSM/VitD *versus* Sal/nSM/VitD (\* $p<0,05$ )].

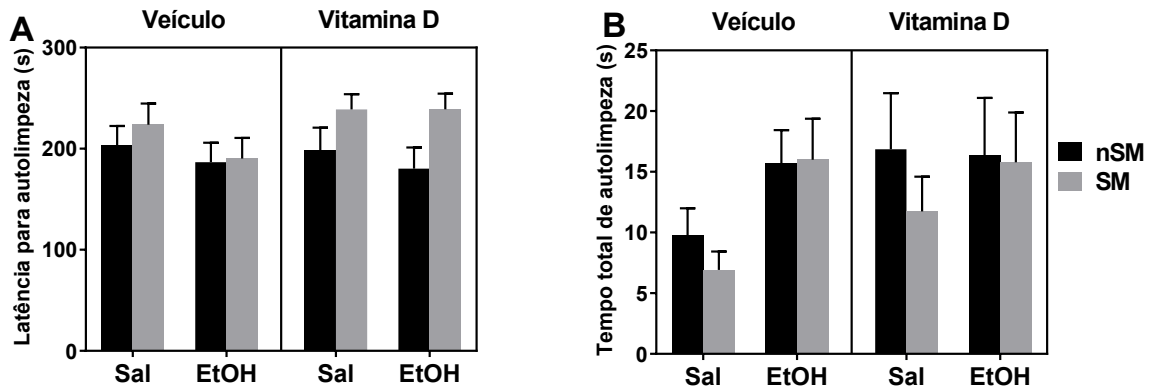
#### 5.4 COMPORTAMENTO DE AUTOLIMPEZA

O teste do comportamento de autolimpeza foi realizado para avaliar o fenótipo tipo-ansioso através da mensuração da latência para iniciar a autolimpeza, tempo total de autolimpeza, além do tempo de autolimpeza rostral e corporal.

Com relação à latência para iniciar autolimpeza, não foram reveladas diferenças entre os sexos [ $F(1, 112)=,56413, p=0,45418$ ]. A partir deste resultado, os grupos de machos e fêmeas foram analisados juntos ( $n=16$  animais/grupo). Conforme apresentado na Figura 9A, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos.

No parâmetro tempo total de autolimpeza, não houve diferenças entre os sexos [ $F(1, 111)=0,23392, p=0,62959$ ]. A partir deste resultado os grupos de machos e fêmeas foram analisados juntos ( $n=15-16$  animais/grupo). Conforme apresentado na Figura 9B, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos.

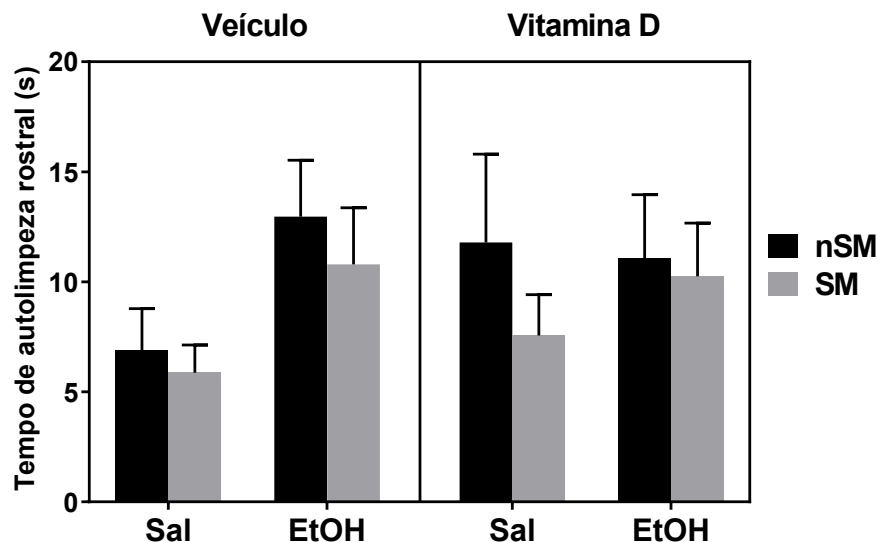
Figura 9 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansioso em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste de comportamento de autolimpeza, nos parâmetros latência para autolimpeza e tempo total de autolimpeza.



As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA multifatorial, seguida pelo teste de Duncan. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (15-16 animais/grupo). Latência para autolimpeza (A). Tempo total de autolimpeza (B).

No tempo de autolimpeza rostral, não foram observadas diferenças entre os sexos [F(1, 111)=0,92801, p=0,33748]. A partir deste resultado os grupos de machos e fêmeas foram analisados juntos (n=15-16 animais/grupo). Conforme representado na Figura 10, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma variável independente ou interação entre elas.

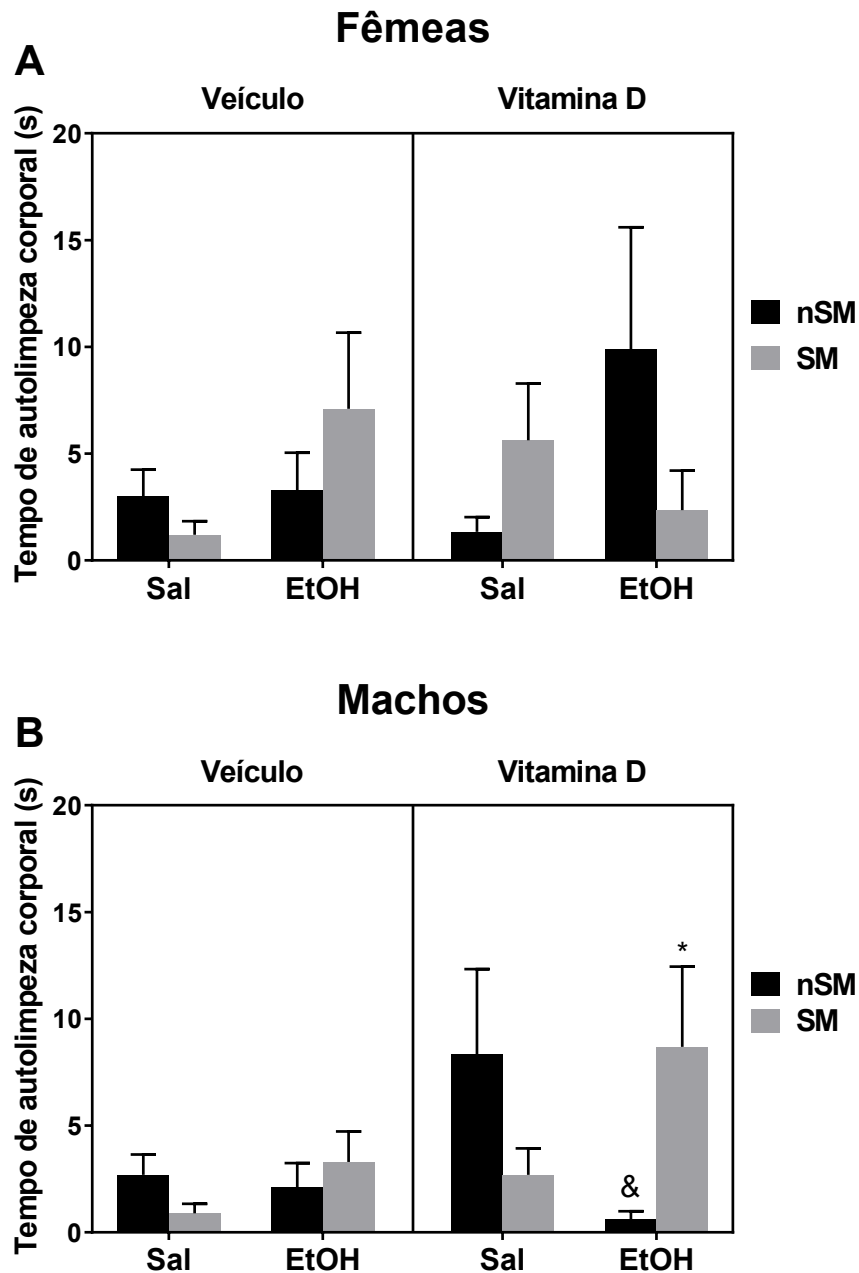
Figura 10 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansiedade em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste de comportamento de autolimpeza, no parâmetro tempo de autolimpeza rostral.



As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA multifatorial, seguida pelo teste Duncan. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (15-16 animais/grupo).

Com relação à autolimpeza corporal, a ANOVA multifatorial não revelou diferenças entre os sexos [ $F(1, 111)=0,20217$ ,  $p=0,65385$ ], no entanto, a análise *post-hoc* mostrou diferença significativa entre o grupo de fêmeas EtOH não separadas tratadas com vitamina D, em comparação com sua contraparte masculina ( $p<0,05$ ). A partir deste resultado, os grupos de machos e fêmeas foram analisados separadamente ( $n=7-8$ ).

Figura 11 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-ansiedade em ratos adolescentes (DPN 40), através do teste de comportamento de autolimpeza, no parâmetro tempo de autolimpeza corporal.



As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA multifatorial, seguida pelo teste Duncan. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (7-8 animais/grupo). Fêmeas (A). Machos (B). & $p<0,05$  versus controle Sal/nSM; \* $p<0,05$  versus controle salina SM.

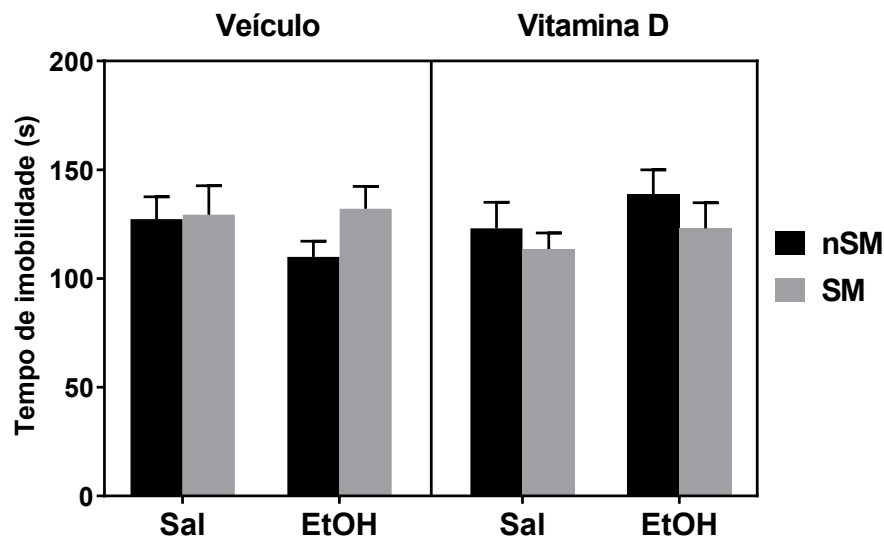
Nas fêmeas (Figura 11A) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Nos grupos de machos (Figura 11B), houve efeito da interação condição-estresse [ $F(1, 56)=7,6858, p=,00754$ ]. O grupo exposto ao EtOH e ao estresse por SM, tratado com vitamina D, teve maior tempo de autolimpeza corporal em comparação com sua contraparte controle salina separado e tratado com vitamina D ( $p<0,05$ ). Estes resultados não foram encontrados entre os grupos tratados com veículo. Além disso, o grupo apenas EtOH, sem estresse por SM, tratado com vitamina D, teve menor tempo de autolimpeza corporal em comparação com sua contraparte controle salina não separado e tratado com vitamina D ( $p<0,05$ ). Nas demais variáveis e interações não foram observadas diferenças significativas.

### 5.5 TESTE DO NADO FORÇADO

O teste do nado forçado foi realizado para avaliar o fenótipo tipo-depressivo através da mensuração do tempo total de imobilidade.

Não foram observadas diferenças significativas entre os sexos [ $F(1, 112)=0,65052, p=0,42164$ ]. A partir disso, os dados de machos e fêmeas foram agrupados ( $n=16$  animais/grupo).

Figura 12 - Efeito do tratamento com vitamina D em um modelo de exposição perinatal ao álcool e estresse por SM no comportamento tipo-depressivo em ratos adolescentes (DPN 45), através do teste do nado forçado ( $n=16$ ).



As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA multifatorial, seguida pelo teste Duncan. Os valores estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. (16 animais/grupo).

Conforme representado na Figura 12, não foram reveladas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais em nenhuma das variáveis analisadas ou interação entre elas: condição [ $F(1, 120)=0,11883, p=0,73$ ]; estresse [ $F(1, 120)=0,00085, p=0,98$ ]; tratamento

[F(1, 120)=0,00007, p=0,99]; condição-estresse [F(1, 120)=0,22025, p=0,64]; condição-tratamento [F(1, 120)=1,7224, p=0,19]; estresse-tratamento [F(1, 120)=2,68, p=0,10]; condição-estresse-tratamento [F(1, 120)=0,74626, p=0,39].

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram realizados dois protocolos de estresse no início da vida: 1) protocolo de estresse físico através da exposição ao álcool, realizado no período perinatal de ratos, que corresponde de forma equivalente, ao terceiro trimestre do período pré-natal da gestação humana; 2) protocolo de estresse psicológico através de um modelo animal de estresse por SM. Além disso, um tratamento repetido com vitamina D foi testado, visando modular possíveis déficits resultantes de ambos (individualmente ou combinados) protocolos de estresse no início da vida. Os parâmetros analisados foram: a) massa corporal dos animais, antes do desmame e ao longo da vida; b) testes comportamentais para a atividade locomotora, comportamento tipo-ansioso e comportamento tipo-depressivo.

Sabe-se que, em humanos, situações desafiadoras no início da vida podem levar a déficits nutricionais tanto pela perda de nutrientes, quanto pelo aumento das necessidades nutricionais e diminuição de apetite (MUHOOZI *et al.*, 2018), resultando em baixo peso ao nascer e ao longo da vida. Por sua vez, estas alterações fisiológicas podem prejudicar processos do neurodesenvolvimento, afetando o desenvolvimento estrutural e funcional do sistema nervoso, desencadeando possíveis transtornos comportamentais, prejudicando o desenvolvimento socioemocional, habilidades cognitivas e motoras (MUHOOZI *et al.*, 2018; WORKU *et al.*, 2018).

Com relação à massa corporal dos animais no período de amamentação, os resultados encontrados na presente pesquisa mostram diferenças importantes nos grupos de fêmeas, mas não nos machos. No DPN6, tanto a exposição ao EtOH, quanto o estresse por SM *per se*, resultaram em diminuição da massa corporal da prole quando comparado com o grupo controle. No entanto, esta diferença não foi observada entre os grupos expostos aos dois protocolos concomitantemente (EtOH+SM). Da mesma forma, no DPN10 foi observado que tanto a exposição ao EtOH, quanto o estresse por SM resultaram em diminuição da massa corporal da prole quando comparado com sua contraparte controle. Além disso, interessantemente, os animais do grupo combinado (EtOH+SM) apresentaram massa corporal elevada em comparação com o grupo que sofreu apenas estresse por SM, sem exposição ao EtOH. Estes resultados sugerem algum tipo de compensação quando ocorre exposição conjunta a duas situações adversas no início da vida.

Ao desmame, no DPN21, observou-se apenas efeito do protocolo de estresse psicológico, onde os animais do grupo controle salina que foram SM pesaram menos que sua contraparte não separada. A massa corporal reduzida nos animais SM pode ter sido devido à ausência de sucção do leite materno durante o período de separação e outros fatores relacionados ao comportamento materno podem estar envolvidos. Neste sentido, Plaut e Davis (1972), usando um modelo de privação materna (desmame prematuro), já exploravam a importância dos diferentes estímulos maternos além da produção e fornecimento de leite, afirmando que, embora alguns efeitos do desmame prematuro estejam intimamente relacionados à disponibilidade de leite materno, outros podem ser atribuídos à ausência de alguns aspectos do comportamento materno, como estimulação térmica e tátil ou, possivelmente, o exemplo materno do comportamento normal de comer e beber.

Sobre a diminuição de massa corporal em animais que receberam álcool, outras pesquisas também relatam menor massa corporal em grupos de animais expostos ao álcool e afirmam que, pelo menos em parte, estas diferenças podem ser explicadas pela interrupção, através da exposição ao EtOH, do eixo 1 do hormônio do crescimento/fator de crescimento semelhante à insulina como resultado da secreção prejudicada do hormônio do crescimento (RONIS *et al.*, 2007).

Filgueiras e colaboradores (2010) utilizaram protocolo de exposição ao álcool semelhante ao demonstrado nesta pesquisa, onde o álcool foi administrado em ratos no mesmo período do desenvolvimento. Eles observaram diferenças na massa corporal da prole antes do desmame, onde animais expostos ao EtOH foram menores em comparação com os animais controle, dados que corroboram com nossos achados. O trabalho de Swart e colaboradores (2018) também adotou protocolo combinado de EtOH e SM, em que observou diferenças na massa corporal dos animais durante o desenvolvimento. Semelhante ao nosso estudo, o grupo exposto ao EtOH apresentou menor massa corporal do que o grupo controle, mas o grupo combinado (EtOH+SM) não diferiu da contraparte controle, sugerindo que o protocolo de SM reduziu os déficits induzidos pela exposição ao álcool. Pesquisa semelhante, que administrou apenas álcool, apenas estresse por SM, ou a combinação de ambos os protocolos, não observaram diferenças na massa corporal dos animais até o desmame (STAPLES *et al.*, 2013). Vale destacar que, na presente pesquisa, as diferenças relacionadas à massa corporal da prole antes do desmame foram observadas apenas em fêmeas, e não entre os grupos de machos. Resultado oposto do encontrado pelo grupo de Swart (2018), onde os machos expostos ao EtOH pesaram menos do que os machos do grupo controle. Essas diferenças relacionadas ao ganho de massa corporal observadas em estudos diversos podem ser explicadas, pelo menos em parte, devido



aos distintos modelos animais usados em cada pesquisa, onde a dose de álcool administrada e o período de exposição são bastante variados.

No que concerne ao peso dos animais ao longo da vida, e concomitante com o período de tratamento com a vitamina D (colecalfiferol) ou controle veículo (óleo mineral), foram observadas diferenças significativas entre as fêmeas, mas não nos machos. No DPN30, o grupo de fêmeas controle salina não separado e tratado com vitamina D, apresentou maior massa corporal do que sua contraparte tratada com veículo. Neste sentido, parece que a vitamina D *per se* modula positivamente o aumento de massa corporal nos animais suplementados. Uma das possíveis explicações se deve ao fato de que o VDR e seu ligante afetam positiva e significativamente o acúmulo de lipídios, como observado no fenótipo *Lean* associado ao modelo animal *knockout* para o receptor VDR (VDR-KO) (NARVAEZ *et al.*, 2009). Outra explicação importante a ser considerada é que, como os animais ainda estavam se desenvolvendo ao longo do tratamento, é possível que a suplementação com vitamina D possa ter aumentado o peso corporal como resultado do conteúdo mineral ósseo aumentado e da reabsorção óssea diminuída, conforme relatado em uma pesquisa em seres humanos, com adolescentes do sexo feminino que receberam suplementação com vitamina D (VILJAKAINEN *et al.*, 2006). Além disso, é importante salientar que a maior parte do calcidiol metabolizado no fígado é depositado no tecido adiposo, seu principal reservatório, sendo que os níveis plasmáticos dessa vitamina refletem sua reserva corporal (PEDROSA & CASTRO, 2005; BARRAL *et al.*, 2007).

Além disso, o grupo de controle salina, SM e tratado com vitamina D, também apresentou maior massa corporal em comparação com sua contraparte exposta ao álcool. Considerando que em ambos os grupos, EtOH ou salina, tratados com controle veículo não houve essa diferença, é possível constatar que a exposição ao álcool no início da vida, de alguma forma, pode interferir no ganho de massa corporal induzido após administração de vitamina D nestes animais. Pesquisas com modelos animais apontam que o consumo crônico de álcool tem efeitos importantes no esqueleto, interferindo no crescimento, qualidade e remodelação óssea, sendo que a exposição ao EtOH aumenta as espécies reativas de oxigênio no tecido ósseo, o que estimula a reabsorção óssea e inibe a formação óssea (CHEN *et al.*, 2006, 2010, 2011; SHANKAR *et al.*, 2006, 2008b). Neste sentido, sabe-se que a suplementação de vitamina D protege contra a perda óssea associada à administração crônica de álcool em camundongos fêmeas (WEZEMAN *et al.*, 2007; MERCER *et al.*, 2012). Em translação com a clínica, sabe-se que crianças com TEAF apresentam um padrão alimentar inadequado, como o menor consumo de gorduras saturadas, vitamina D e cálcio, e que a suplementação nutricional (ex:

vitamina D) pode atenuar alguns déficits decorrentes destes transtornos, incluindo o aumento na massa corporal (FUGLESTAD *et al.*, 2013).

A ingestão de EtOH pode alterar a expressão dos genes CYP27B1 e CYP24A1 renais, enzimas envolvidas, respectivamente, na síntese e inativação de calcitriol (GARCIA-QUIROZ *et al.*, 2016; CASTRO, 2011). Em seu trabalho, García-Quiroz e colaboradores (2016) usaram um modelo animal de exposição moderada crônica ao EtOH, combinado com tratamento com 25-hidroxivitamina D3 (calcidiol), e avaliaram os efeitos na expressão gênica das enzimas CYP27B1 e CYP24A1, envolvidas no metabolismo da vitamina D nos rins e em células tumorais mamárias nestes animais. Seus resultados mostraram que o peso corporal médio final foi maior em grupos tratados com vitamina D. Além disso, de forma geral, seus resultados sugerem que a ingestão moderada de EtOH diminui a bioconversão renal e tumoral de calcidiol em calcitriol (metabólito ativo da vitamina D) enquanto favorece a degradação de ambos os metabólitos da vitamina D em células de câncer de mama, resultando em níveis séricos reduzidos de calcitriol, o que significa redução nos efeitos mediados por vitamina D.

Sobre o fato de que os dados encontrados na presente pesquisa mostraram efeitos da suplementação com vitamina D apenas nos grupos de fêmeas e não em machos, infere-se que possa ter relação com os hormônios sexuais. Em seu estudo, utilizando um modelo animal para esclerose múltipla, denominado encefalomielite autoimune experimental, Nashold e colaboradores (2009) mostraram pela primeira vez que existe uma sinergia entre um hormônio sexual e a vitamina D3 no controle de uma doença autoimune e destacam seus resultados como sendo a primeira evidência de que o 17 $\beta$ -estradiol é essencial para a expressão e função do gene VDR no SNC inflamado. Seus dados mostraram que a expressão e função de alto nível do gene VDR na medula espinhal requeriam um estímulo inflamatório, 17 $\beta$ -estradiol e vitamina D3 na dieta suficiente para apoiar a síntese *in situ* de 1,25-(OH) 2D3. O aumento da 1,25-(OH) 2D3 e VDR dependente da biossíntese de 17 $\beta$ -estradiol pode ser um mecanismo que permite que os sistemas endócrinos de estrogênio e vitamina D3 funcionem sinergicamente em indivíduos do sexo feminino após a maturação sexual. Um segundo mecanismo de sinergia entre os sistemas endócrinos de estrogênio e vitamina D3 parece ser a supressão, mediada por 17 $\beta$ -estradiol, da expressão do gene CYP24A1, levando ao acúmulo de calcitriol nos diferentes tecidos e ao aprimoramento da expressão do gene VDR em mulheres (NASHOLD *et al.*, 2009). A expressão transcricional do gene VDR está aumentada na presença de 17 $\beta$ -estradiol em vários tecidos, tais como osteoblastos, mucosa duodenal, fígado, entre outros (LIEL *et al.*, 1992; SMIRNOFF *et al.*, 1999; DUQUE *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2002). Nashold e colaboradores (2009) consideraram intrigante a falta de interação entre 17 $\beta$ -estradiol e vitamina D3 no sexo

masculino, uma vez que os homens expressam o receptor para estrogênio (ER), e o 17 $\beta$ -estradiol é um regulador eficaz da encefalomielite autoimune experimental no sexo masculino (MATEJUK *et al.*, 2001). Neste sentido, a equipe de Nashold (2009) discute que possa haver regulação diferencial do gene CYP24A1 entre homens e mulheres, sendo que, em trabalho anterior, relataram que os machos expressaram níveis mais altos de mRNA de CYP24A1 no SNC do que as fêmeas, e não mostraram repressão completa da expressão do gene CYP24A1 durante a inflamação, assim como as fêmeas (SPACH *et al.*, 2005). Afirmam que isso resultou em uma falha em acumular calcitriol, o que poderia prejudicar os benefícios derivados do aprimoramento mediado por 17 $\beta$ -estradiol na expressão de VDR (NASHOLD *et al.*, 2009).

A presente pesquisa avaliou a atividade locomotora dos animais por meio do teste do campo aberto. Este comportamento é analisado a partir de dados referentes à distância total percorrida (s), à velocidade média (m/s) e ao tempo total de mobilidade. De forma geral, fêmeas expostas ao EtOH *per se* ou SM *per se*, apresentam uma hiperatividade quando comparadas com machos do mesmo grupo. No entanto, grupos com protocolos combinados, EtOH+SM, não mostram essa hiperatividade, sugerindo uma interação entre os dois modelos de estresse no início da vida. Este resultado corrobora com estudo semelhante, onde foram administrados protocolos e exposição ao álcool e estresse por SM, e revelou hiperatividade tanto do grupo EtOH, quanto no grupo SM, mas não na interação entre eles (SWART *et al.*, 2018). Além disso, muitos destes resultados, foram encontrados apenas nos grupos tratados com vitamina D, sugerindo que o tratamento também pode estar relacionado com aumento da atividade em fêmeas quando comparadas com machos.

Ao analisar a atividade locomotora de forma restrita ao sexo, foi possível verificar que fêmeas expostas ao EtOH *per se*, à SM *per se*, ou no protocolo combinado, foram mais ativas que suas contrapartes dos grupos de controle, com destaque para o parâmetro velocidade média, onde todos os grupos tiveram resultados estaticamente significativos. Novamente, essa hiperatividade foi observada apenas nos animais tratados com vitamina D, reforçando o envolvimento deste tratamento com aumento na atividade. Importante destacar que essa hiperatividade não foi observada em machos. Dados clínicos revelaram que crianças com transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) apresentaram níveis séricos reduzidos de vitamina D, comparadas com indivíduos não diagnosticados. Além disso, a redução na concentração sérica de vitamina D em meninos TDAH foi mais grave do que em meninas (FASIHPOUR *et al.*, 2019). Neste sentido, a deficiência ou insuficiência de vitamina D em indivíduos com TEAF pode ser dependente do sexo, onde a suplementação teria efeito diferente em meninos e meninas. A presente pesquisa não avaliou os níveis séricos de calcidiol

circulante nos animais testados, no entanto, trabalho semelhante não encontrou diferenças significativas nos níveis sanguíneos de vitamina D em animais expostos ao álcool (IDRUS *et al.*, 2013).

Também foram avaliados parâmetros relacionados ao comportamento tipo-ansioso, através de dois testes comportamentais. O teste do campo aberto, onde o maior tempo de permanência nos cantos e menor tempo de permanência no centro refletem um comportamento semelhante à ansiedade. E a análise do comportamento de autolimpeza, onde a menor latência para iniciar a autolimpeza, maior tempo de autolimpeza total, bem como alterações no tempo de autolimpeza rostral e corporal, também são classificados como comportamento semelhante à ansiedade.

Nossos achados mostram que o EtOH *per se* foi capaz de induzir um comportamento tipo-ansioso, onde animais do grupo EtOH/nSM/Veículo ficaram menos tempo na zona central do campo aberto em comparação com o grupo controle Sal/nSM/Veículo. Ressalta-se que este resultado não foi observado no grupo tratado com vitamina D, o que sugere um importante efeito tipo-ansiolítico deste tratamento. Além disso, uma diferença foi observada no parâmetro tempo nos cantos, onde os animais expostos ao protocolo de SM *per se*, mas não expostos ao EtOH, permaneceram menos tempo nos cantos em comparação com o controle. Essa diferença só foi observada no grupo tratado com vitamina D. Neste caso a vitamina D pode estar atuando como fator ansiolítico nos animais que passaram por estresse psicológico no início da vida. No entanto, neste caso, o modelo de estresse por SM, individualmente ou combinado com EtOH, não demonstra aumentar o comportamento semelhante à ansiedade, tendo em vista que estes grupos não diferiram dos controles. Assim, o tratamento com vitamina D poderia estar aumentando o comportamento de risco em indivíduos suscetíveis. Staples e colaboradores (2013), também relacionaram a EPA com um protocolo de estresse pré-natal e analisou comportamento tipo-ansioso. Interessantemente, seus dados são um pouco distintos do observado na presente pesquisa, onde os animais que passaram pelo estresse psicológico, mas não no grupo apenas EtOH ou no grupo combinado de EtOH + SM, apresentam aumento no comportamento tipo-ansioso. No entanto esta pesquisa utilizou outro modelo de EPA e não testou nenhum tipo de intervenção visando reverter os déficits.

Um artigo de revisão que vincula vitamina D a ansiedade e transtornos afetivos, concluiu que estes distúrbios afetivos estão associados a níveis significativamente mais baixos de calcidiol, precursor do hormônio ativo calcitriol, tanto para homens quanto para mulheres (BIČÍKOVÁ *et al.*, 2015). Poucos trabalhos associaram tratamento com vitamina D, TEAF e SM (FUGLESTAD *et al.*, 2013; IDRUS *et al.*, 2013) e analisaram apenas parâmetros

cognitivos. Nesta pesquisa observamos que a vitamina D foi capaz de reverter o comportamento tipo-ansioso nos animais do grupo que recebeu apenas EtOH, que não foi exposto ao protocolo de SM, tanto por elevar o tempo no centro do campo aberto ao nível do grupo controle, quanto por reduzir o tempo de permanência nos cantos do aparato quando comparado com o grupo controle igualmente tratado com vitamina D. A literatura apresenta resultados que atestam os benefícios da suplementação com vitamina D na redução de quadros de ansiedade. Um estudo recente (EID *et al.*, 2019) investigou os efeitos da suplementação de vitamina D nos sintomas clínicos do Transtorno de Ansiedade Generalizada e nos biomarcadores neuroquímicos, incluindo serotonina, neopterinina e quinurenina, em pacientes humanos. Este estudo observou melhoras significativas nos indivíduos que foram receberem vitamina D. Além disso, as concentrações séricas de serotonina aumentaram enquanto a neopterinina sérica diminuiu significativamente nos pacientes tratados com vitamina D versus pacientes não tratados. Não foram encontradas diferenças nas concentrações séricas de quinurenina (EID *et al.*, 2019). Além disso, uma recente revisão da literatura indicou que a suplementação de vitamina D está associada à redução dos sintomas de depressão e ansiedade, principalmente em estudos clínicos (CASSEB, KASTER & RODRIGUES, 2019). Destaca-se que a presente pesquisa relata pela primeira vez os efeitos positivos do tratamento com vitamina D no comportamento tipo-ansioso induzido por EPA em ratos.

Na avaliação do comportamento de autolimpeza, a latência e o tempo total de autolimpeza não foram alterados entre os diferentes grupos, bem como, o tempo de autolimpeza rostral foi semelhante a todos. No entanto, o tempo de autolimpeza corporal foi aumentado em animais submetidos ao protocolo combinado de exposição ao EtOH e SM e em animais expostos apenas ao EtOH, não sendo observado em grupos expostos ao protocolo de SM isoladamente. No entanto, estas diferenças no tempo total de autolimpeza corporal estão presentes apenas nos grupos tratados com vitamina D, reforçando negativamente sua interação com os modelos de estresse no início da vida. Esta alteração pode refletir num desbalanço na organização de autolimpeza cefalocaudal, sabe-se que os ratos geralmente exibem padrões de higiene complexos e organizados, com movimentos e transições mais simétricos entre os estágios (BERRIDGE, 1990). Nossos resultados estão de acordo com estudos que relatam que alguns ansiolíticos (como por exemplo, o EtOH) aumentam o tempo de autolimpeza em ratos (FILE *et al.*, 1988; OSBORNE *et al.*, 1993).

Uma possível explicação para essa diferença observada apenas nos grupos que receberam vitamina D pode estar no fato de que o tratamento se deu como uma administração terapêutica, após o período de exposição ao álcool, e não como uma medida protetora. Neste sentido,

Alfawaz e colaboradores (2014) trabalharam com um modelo de exposição ao ácido propiônico (PPA), substância tóxica que parece estar envolvida na indução de características autísticas, e testaram o uso de vitamina D como tratamento protetor (antes da administração do PPA) ou terapêutico (após o PPA). Eles encontraram um nível mais alto de vitamina D no plasma de ratos tratados com PPA em comparação com o controle e discutiram que a vitamina D plasmática mais alta poderia refletir uma concentração mais baixa no SNC, o que poderia ser devido a um número anormalmente baixo de VDRs no encéfalo de ratos tratados com a substância tóxica. Concluíram que o tratamento protetor com vitamina D mostrou um efeito maior em comparação com o tratamento terapêutico na neurotoxicidade induzida por PPA, pois houve uma melhoria notável dos parâmetros bioquimicamente prejudicados que representam os processos neuroquímicos, inflamação e desintoxicação (ALFAWAZ *et al.*, 2014). Isso pode sugerir que a vitamina D3 administrada em caráter protetor, mas não terapêutico, pode desempenhar um papel importante nos mecanismos relevantes para a proteção contra a neurotoxicidade do PPA através da regulação positiva da expressão de VDR no encéfalo de ratos tratados.

O comportamento tipo-depressivo foi avaliado através do teste do nado forçado. Nenhum dos grupos nesta pesquisa apresentaram comportamento tipo-depressivo. Importante lembrar que os animais foram avaliados no período da adolescência e que alguns sintomas relacionados às alterações do humor podem aparecer mais tarde na vida. Dados da literatura, mostram que o estresse psicológico no início da vida, através do modelo de privação materna, desencadeia comportamento semelhante à depressão em animais adultos jovens, mas não em adolescentes. No entanto, durante a adolescência estes mesmos animais já apresentam alterações bioquímicas, como o nível de citocinas pró-inflamatórias aumentado (RÉUS *et al.*, 2017), fator que pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios do humor mais tarde na vida.

## 7 CONCLUSÃO

A principal contribuição desta pesquisa foi demonstrar, pela primeira vez na literatura, que o tratamento com vitamina D no período da infância, é capaz de reverter o comportamento tipo-ansioso em ratos adolescentes que foram expostos ao protocolo de EPA.

Outro fator observado foi a hiperatividade observada nas fêmeas, independentemente do modelo de estresse inicial. Ressalta-se que este aumento na atividade esteve presente apenas nos grupos tratados com vitamina D. Por fim, não foi observado comportamento tipo-depressivo nestes animais.

Além disso, este trabalho demonstrou que exposição precoce ao EtOH e ao estresse por SM parecem ter mais efeitos quando analisados isoladamente do que no protocolo combinado. Animais expostos ao EtOH ou SM apresentaram menor massa corporal em comparação com o controle. No entanto animais com protocolos combinados não apresentaram esta diferença. Além disso, o tratamento com vitamina D parece atenuar estes déficits nutricionais, outra consideração positiva relacionada à intervenção farmacológica.

Ressalta-se que o tratamento com vitamina D ocorreu em idade correspondente à infância em humanos, momento em que podem se destacar os déficits comportamentais, devido ao início da idade escolar e a participação ativa de outras pessoas, além do círculo familiar, nos cuidados com essas crianças. Além disso, as avaliações comportamentais foram realizadas no período correspondente ao início da adolescência em humanos e após encerrar o período de tratamento, podendo-se especular que a administração, e posterior retirada, da vitamina D pode ter resultado em alterações em longo prazo, resultantes do período de desenvolvimento na infância, no metabolismo da vitamina D como alterações nas enzimas de bioconversão e degradação do calcitriol, bem como na expressão gênica do VDR.

Os modelos de estresse precoce podem induzir transtornos em longo prazo, incluindo idade adulta. Por isso, sugere-se a avaliação destes comportamentos em idades posteriores. Além disso, o tratamento com vitamina D também pode ter efeitos diferentes se administrado em outros períodos do desenvolvimento.

Os experimentos realizados neste estudo resultaram na coleta e armazenamento dos encéfalos de todos os animais. Estas amostras serão processadas posteriormente visando analisar a proliferação e diferenciação celular através da imunomarcação por Ki67 e doblecortina (DCX), respectivamente. Além disso, uma parte das amostras se destinou à avaliação da arborização dendrítica, através da técnica de Golgi, onde os encéfalos foram mergulhados em uma solução à base de cloreto de mercúrio (Golgi-COX) para impregnação e marcação neuronal.

## 8 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, D. P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. **Pathologie Biologie**, v.49, p. 703–709, 2001.
- AINGE, J.A.; HERON-MAXWELL, C.; THEOFILAS, P.; WRIGHT, P.; DE HOZ, L.; WOOD, E.R. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. **Behav Brain Res.** 167(1):183-195, 2006.
- AN, L.; ZHANG, T. Spatial cognition and sexually dimorphic synaptic plasticity balance impairment in rats with chronic prenatal ethanol exposure. **Behavioural brain research.** v. 256, p. 564-574, 2013.
- ARAGON, C.M.; ROGAN, F.; AMIT, Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 93–98, 1992.
- ARTEEL, G.; MARSANO, L.; MENDEZ, C.; BENTLEY, F.; MCCLAIN, C.J. Advances in alcoholic liver disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** 17(4):625-47, 2003.
- BACULIS, B.C.; DIAZ, M.R.; VALENZUELA, C.F. Third Trimester-Equivalent Ethanol Exposure Increases Anxietylike Behavior and Glutamatergic Transmission in the Basolateral Amygdala. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 137, p. 78-85, 2015.
- BARR, H.M.; STREISSGUTH, A.P. Identifying maternal self-reported alcohol use associated with fetal alcohol spectrum disorders. **Alcohol Clin Exp Res.** 25(2):283-7, 2001.
- BARRAL, D.; BARROS, A.C.; ARAÚJO, R.P.C. Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr**, João Pessoa, 7(3):309-315, 2007.
- BERMAN, R. F. & HANNIGAN, J. H. Effects of Prenatal Alcohol Exposure on the Hippocampus: Spatial Behavior, Electrophysiology, and Neuroanatomy. **HIPPOCAMPUS**, v. 10, p. 94-110, 2000.
- BERRIDGE KC. Comparative fine structure of action: rules of form and sequence in the grooming patterns of six rodent species. **Behavior.** 113:21–56, 1990
- BIČÍKOVÁ, M.; DUŠKOVÁ, M.; VÍTKŮ, J.; KALVACHOVÁ, B.; ŘÍPOVÁ, D.; MOHR, P.; STÁRKA, L. Vitamin D in Anxiety and Affective Disorders. **Physiol. Res.** 64 (Suppl. 2): S101-S103, 2015
- BRADY, M. L.; DIAZ, M. R.; IUSO, A.; EVERETT, J. C.; VALENZUELA, C. F.; CALDWELL, K. K. Moderate prenatal alcohol exposure reduces plasticity and alters NMDA receptor subunit composition in the dentate gyrus. **J Neurosci.** v. 33, n. 3, p. 1062-1067, 2013.
- BROCARDO, P.S.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. **Brain Research Reviews**, v. 67, p. 209-225, 2011.
- BROCARDO, P. S.; BOEHME, F.; PATTEN, A.; COX, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative



stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1607-1618, 2012.

BROLESE, G.; LUNARDI, P.; BROETTO, N.; ENGELKE, D.S.; LÍRIO, F.; BATASSINI, C.; TRAMONTINA, A.C.; GONÇALVES, C.A. Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 269, p. 175-184, 2014.

BUELL, J. S. & DAWSON-HUGHES, B. Vitamin D and neurocognitive dysfunction: preventing "D"ecline? **Mol Aspects Med.** v. 29, n. 6, p. 415-422, Dec2008.

BURNE, T.H.J *et al.* Transient prenatal Vitamin D deficiency is associated with hyperlocomotion in adult rats. **Behavioural brain research.** v. 154, n. 2, p. 549-555, 2004.

CALDWELL, K. K.; SHEEMA, S.; PAZ, R. D.; SAMUDIO-RUIZ, S. L.; LAUGHLIN, M. H.; SPENCE, N. E.; ROEHLK, M. J.; ALCON, S. N.; ALLAN, A. M. Fetal alcohol spectrum disorder-associated depression: evidence for reductions in the levels of brain-derived neurotrophic factor in a mouse model. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, n. 4, p. 614-624, 2008.

CAMARGO, A.; DALMAGRO, A. P.; RIKEL, L.; DA SILVA, E. B.; SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; ZENI, A. L. B. Cholecalciferol counteracts depressive-like behavior and oxidative stress induced by repeated corticosterone treatment in mice. **European Journal of Pharmacology.** v. 833, p. 451-461, 2018.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 35 Suppl 2, p. S101-111, 2013.

CASSEB, G.A.S.; KASTER, M.P.; RODRIGUES, A.L.S. Potential Role of Vitamin D for the Management of Depression and Anxiety. **CNS Drugs**, 33(7):619-637, 2019.

CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. Revisão. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 55/8, 2011.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASDs)**. 2014.

CHAKRABORTY, R.; CHATTERJEE, A.; CHOUDHARY, S.; CHAKRABORTY, P. Neuroplasticity--a paradigm shift in neurosciences. **J Indian Med Assoc.**, v. 105 (9), p. 513-514, 516-518, 520-511, 2007.

CHEN, J.R.; HALEY, R.L.; HIDESTRAND, M.; SHANKAR, K.; LIU, X.; LUMPKIN, C.K.; SIMPSON, P.M.; BADGER, T.M.; RONIS, M.J. Estradiol protects against ethanol-induced bone loss by inhibiting up-regulation of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in osteoblasts. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 319:1182–1190, 2006.

CHEN, J.R.; LAZARENKO, O.P.; SHANKAR, K.; BLACKBURN, M.L.; BADGER, T.M.; RONIS, M.J. A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment

of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. **J. Bone Miner. Res.**, 25:1117–1127, 2010.

CHEN, J.R.; LAZARENKO, O.P.; SHANKAR, K.; BLACKBURN, M.L.; LUMPKIN, C.K.; BADGER, T.M.; RONIS, M.J. Inhibition of NADPH oxidases prevents chronic ethanol-induced bone loss in female rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 336:734–742, 2011.

CHOI, I. Y.; ALLAN, A. M.; CUNNINGHAM, L. A. Moderate Fetal Alcohol Exposure Impairs the Neurogenic Response to an Enriched Environment in Adult Mice. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 29, n. 11, p. 2053-2062, 2005.

CLARREN SK, SMITH DW. The fetal alcohol syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 298, p. 1063–1067, 1978.

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

COMEAU, W. L.; WINSTANLEY, C. A.; WEINBERG, J. Prenatal alcohol exposure and adolescent stress - unmasking persistent attentional deficits in rats. **Eur J Neurosci.** v. 40, n. 7, p. 3078-3095, 2014.

CHRISTIE, B. R.; SWANN, S. E.; FOX, C. J.; FROC, D.; LIEBLICH, S. E.; REDILA, V.; WEBBER, A. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. **Eur J Neurosci.** v. 21, n. 6, p. 1719-1726, 2005.

CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; BENN, B. *et al.* Vitamin D: molecular mechanism of action. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1116:340–348, 2007

DE OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E. L.; DOS SANTOS, D. B.; PIERMARTIRI, T. C.; DUTRA, R. C.; PINTON, S.; TASCA, C. I.; FARINA, M.; PREDIGER, R. D.; DE BEM, A. F. Increased susceptibility to amyloid-beta-induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **J Alzheimers Dis.** v. 41, n. 1, p. 43-60, 2014.

DEITRICH, R. Ethanol as a Prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects – a commentary. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 35, p. 581–583, 2011.

DELUCA, G. C.; KIMBALL, S. M.; KOLASINSKI, J.; RAMAGOPALAN, S. V.; EBERS, G. C. Review: the role of vitamin D in nervous system health and disease. **Neuropathol Appl Neurobiol.** v. 39, n. 5, p. 458-484, 2013.

DIXON, K. M. & MASON, R. S. Vitamin D. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 41, n. 5, p. 982-985, 2009.

DÖRRIE, N.; FÖCKER, M.; FREUNSCHT, I.; HEBEBRAND, J. Fetal alcohol spectrum disorders. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v. 23, p. 863–875, 2014.

DREW, Paul D. *et al.* Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex in a mouse model of

fetal alcohol spectrum disorders. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 39, n. 3, p. 445-454, 2015.

DUQUE, G.; EL ABDAIMI, K.; MACORITTO, M.; MILLER, M.M.; KREMER, R. Estrogens (E2) regulate expression and response of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in bone cells: changes with aging and hormone deprivation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 299: 446–454, 2002.

EELLEN, G.; VERLINDEN, L.; VAN CAMP, M. *et al.* The effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of DNA replication genes. **J Bone Miner Res.** V. 19:133–146, 2004.

EID, A.; KHOJA, S.; ALGHAMDI, S.; ALSUFIANI, H.; ALZEBEN, F.; ALHEJAILI, N.; TAYEB, H.O.; TARAZI, F. Vitamin D supplementation ameliorates severity of generalized anxiety disorder (GAD). **Metab Brain Dis.**, 34(6):1781-1786, 2019.

ERIKSSON, C.J. Acetaldehyde metabolism in vivo during ethanol oxidation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 85A, p. 319–341, 1977.

ETHEN, M.K.; RAMADHANI, T.A.; SCHEUERLE, A.E.; CANFIELD M.A.; WYSZYNSKI, D.F.; DRUSCHEL, C.M.; ROMITTI, P.A. Alcohol consumption by women before and during pregnancy. **Matern Child Health J.**, v. 13, p.274–285, 2009.

EYLES, D.; BROWN, J.; MACKAY-SIM, A.; MCGRATH, J.; FERON, F. Vitamin d3 and brain development. **Neuroscience.** v. 118, n. 3, p. 641-653, 2003.

EYLES, D. W.; FERON, F.; CUI, X.; KESBY, J. P.; HARMS, L. H.; KO, P.; MCGRATH, J. J.; BURNE, T. H. Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. **Psychoneuroendocrinology.** v. 34 Suppl 1, p. S247-257, 2009.

FASIHPOUR, B.; MOAYERI, H.; SHARIAT, M.; KEIHANIDOUST, Z. EFFATPANA, M.; KHEDMAT, L. Vitamin D deficiency in school-age Iranian children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) symptoms: A critical comparison with healthy controls. **Child Neuropsychol.** 13:1-15, 2019.

FEDOTOVA, J.; DUDNICHENKO, T.; KRUZLIAK, P.; PUCHAVSKAYA, Z. Different effects of vitamin D hormone treatment on depression-like behavior in the adult ovariectomized female rats. **Biomed Pharmacother.** v. 84, p. 1865-1872, 2016.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S.; WALKER, J.H. Comparison of adaptive responses in familiar and novel environments: modulatory factors. **Ann NY Acad Sci.** 525:69–79, 1998.

FILGUEIRAS, C.C.; KRAHE, T.E.; MEDINA, A.E. Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. **Neurosci Lett.** v. 473(3), p. 202–207, 2010.

FLOYD, R.L.; WEBER, M.K.; DENNY, C.; O'CONNOR, M.J. Prevention of fetal alcohol spectrum disorders. **Dev Disabil Res Rev**, v. 15, p. 93–199, 2009.

FREIRE, T.M. *et al.* Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** Rio De Janeiro, 2005.

FUGLESTAD, A.J. *et al.* Inadequate intake of nutrients essential for neurodevelopment in children with fetal alcohol spectrum disorders (FASD). **Neurotoxicol Teratol.** 0: 128–132., 2013.

GARCIA, R.; ROSSI, N.F.; GIACGETI, C.M. Perfil de habilidades de comunicação de dois irmãos com a Síndrome Alcoólica Fetal. Ver. **CEFAC.** V. 9 (4), p. 461-468, 2007.

GERSHON, A.; SUDHEIMER, K.; TIROUVANZIAM, R.; WILLIAMS, L. M.; O'HARA, R. The Long-Term Impact of Early Adversity on Late-Life Psychiatric Disorders. **Current Psychiatry Reports.** v. 15, n. 4, 2013.

GILL, K.; MENEZ, J. F.; LUCAS, D.; DEITRICH R. A. Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. **Alcohol.Clin.Exp.Res.**, v. 16, p. 910–915, 1992.

GIL-MOHAPPEL, J.; BOEHME, F.; PATTEN, A.; COX, A.; KAINER, L.; GILES, E.; BROCARD, P. S.; CHRISTIE, B. R. Altered adult hippocampal neuronal maturation in a rat model of fetal alcohol syndrome. **Brain Res.** v. 1384, p. 29-41, 2011.

GIL-MOHAPPEL, J. *et al.* Ethanol Exposure During Development, and Brain Oxidative Stress. In: Victor R. Preedy (Ed.). **NEUROSCIENCE OF ALCOHOL.** Mechanisms and Treatment. London: Elsevier, 2019. p. 493-503.

GOEKE, C. M.; ROBERTS, M. L.; HASHIMOTO, J. G.; FINN, D. A.; GUIZZETTI, M. Neonatal Ethanol and Choline Treatments Alter the Morphology of Developing Rat Hippocampal Pyramidal Neurons in Opposite Directions. **Neuroscience**, v. 374, p. 13-24, 2018.

GUERRI, C. Neuroanatomical and Neurophysiological Mechanisms Involved in Central Nervous System Dysfunctions Induced by Prenatal Alcohol Exposure. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 22 (2), p. 304-312, 1998.

GUERRI, C. & RENAULT-PIQUERAS, J. Alcohol, Astroglia, and Brain Development. **Molecular Neurobiology.** v. 15, p. 65-81, 1997.

GUO, X.; YUAN, J.; WANG, J.; CUI, C.; JIANG P. Calcitriol alleviates global cerebral ischemia-induced cognitive impairment by reducing apoptosis regulated by VDR/ERK signaling pathway in rat hippocampus. **Brain Res.** 1724:146430, 2019.

GUPTA, K.K.; GUPTA, V.K.; SHIRASAKA, T. An update on Fetal Alcohol Syndrome-pathogenesis, risks, and treatment. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research.** V. 40, N. 8, P.1594-1602, 2016.

GRINFELD, H. **Consumo nocivo de álcool durante a gravidez. Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual.** Org. Andrade, A.G.; Anthony, J.C.; Silveira, C.M. Barueri, SP: Minha Editora, 2009.

GRINFELD, H.; GOLDENBERG, S; SEGRE, C.A.M.; CHADI, G. Fetal alcohol syndrome in São Paulo, Brazil. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**. V. 13, p. 496-497, 1999.

HAMILTON, D.A. *et al.* Moderate prenatal alcohol exposure and quantification of social behavior in adult rats. **Journal of visualized experiments: JoVE**. n. 94, 2014.

HAJILUIAN, G.; ABBASALIZAD FARHANGI, M.; NAMENI, G.; SHAHABI, P.; MEGARI-ABBASI, M. Oxidative stress-induced cognitive impairment in obesity can be reversed by vitamin D administration in rats. **Nutr Neurosci**. 21(10):744-752, 2018.

HELLEMANS, K.G.C.; SLIWOWSKA, J.H.; VERMA, P.; WEINBERG, J. Prenatal alcohol exposure: Fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, p. 791-807, 2010.

HERSCOVITCH, K.; DAULETBAEV, N.; LANDS, L. C. Vitamin D as an anti-microbial and anti-inflammatory therapy for Cystic Fibrosis. **Paediatr Respir Ver**. v. 15, n. 2, p. 154-162, 2014.

HOLICK, M.F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutr Rev.**, 66(10 Suppl 2):S182-94, 2008.

HOLLIS, B. W. Vitamin D requirement during pregnancy and lactation. **J Bone Miner Res**. v. 22 Suppl 2, p. V39-44, 2007.

HOSSEIN-NEZHAD, A. & HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clin Proc**. v. 88, n. 7, p. 720-755, 2013.

HUNT, W.A. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-a review. **Alcohol**, v. 13, p. 147-151, 1996.

IDRUS, N.M.; HAPPER, J.P.; THOMAS, J.D. Cholecalciferol attenuates perseverative behavior associated with developmental alcohol exposure in rats in a dose-dependent manner. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 136: 146-149, 2013.

IKONOMIDOU, C.; BITTIGAU, P.; ISHIMARU, M. J.; WOZNIAK, D. F.; KOCH, C.; GENZ, K.; PRICE, M. T.; STEFOVSKA, V.; HÖRSTER, F.; TENKOVA, T.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J. W. Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome. **Science**, v. 287, 2000.

JONES, G. Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D(2), vitamin D(3), and vitamin D analogs. **Annu Rev Nutr**. v. 33, p. 23-44, 2013.

JONES, K.L.; SMITH, D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. **Lancet**, v. 302, p. 999-1001, 1973.

JONES, K.L.; SMITH, D.W.; ULLELAND, C.N.; STREISSGUTH, P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet**, v. 1, p. 1267-1271, 1973.

KALUEFF, A. V. & TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Res Brain Res Protoc**. v. 13, n. 3, p. 151-158, 2004.

KALUEFF, A. V. & TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **J Neurosci Methods**. v. 143, n. 2, p. 169-177, 2005.

KALUEFF, A. V.; ALDRIDGE, J. W.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; TUOHIMAA, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nat Protoc**. v. 2, n. 10, p. 2538-2544, 2007.

KANNANGARA, T. S.; BOSTROM, C. A.; RATZLAFF, A.; THOMPSON, L.; CATER, R. M.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. **PLoS One**. v. 9, n. 8, p. e103155, 2014.

KANG, H. & SCHUMAN, E. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. **Science**. v. 267(5204), p. 1658–1662, 1995.

KEIVER, K.; HERBERT, L.; WEINBERG, J. Effect of maternal ethanol consumption on maternal and fetal calcium metabolism. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 20 (7), p. 1305-1312., 1996.

KIM, J.-Y.; MCHALE, S. M.; OSGOOD, D. W.; CROUTER, A. C. Longitudinal Course and Family Correlates of Sibling Relationships From Childhood Through Adolescence. **Child Development**. v. 77 (6), p. 1746 – 1761, 2006.

KLINTSOVA, A. Y.; HELFER, J. L.; CALIZO, L. H.; DONG, W. K.; GOODLETT, C. R.; GREENOUGH, W. T. Persistent impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 12, p. 2073-2082, 2007.

KOMOROWSKA, J.; PELLIS, S. M. Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. **Behavioural processes**, v. 67, n. 2, p. 287–293, 2004.

KREISEL, T.; FRANK, M. G.; LICHT, T.; RESHEF, R.; BEN-MENACHEM-ZIDON, O.; BARATTA, M. V.; MAIER, S. F.; YIRMIYA, R. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. **Mol Psychiatry**. v. 19, n. 6, p. 699-709, 2014.

KULIE, T.; GROFF, A.; REDMER, J.; HOUNSHELL, J.; SCHRAGER, S. Vitamin D: An Evidence-Based Review. **J Am Board Fam Med**. Vol. 22 No. 6, p. 698-706, 2009.

LANGE, S.; SHIELD, K.; REHM, J.; POPOVA, S. Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Child Care Settings: A Meta-analysis. **Pediatrics**. v. 132, n. 4, p. e980-e995, 2013.

LANGUB, M.; HERMAN, J.; MALLUCHE, H.; KOSZEWSKI, N. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. **Neuroscience**. v. 149, p. 49–56, 2001.

LEE, Y.; ROWE, J.; ESKUE, K.; WEST, J.R.; MAIER, S.E. Alcohol exposure on postnatal day 5 induces Purkinje cell loss and evidence of Purkinje cell degradation in lobule I of rat cerebellum. **Alcohol**, v. 42, p. 295-302, 2008.

LIANG, Q.; CAI, C.; DUAN, D.; HU, X.; HUA, W.; JIANG, P.; ZHANG, L.; XU, J.; GAO, Z. Postnatal Vitamin D Intake Modulates Hippocampal Learning and Memory in Adult Mice. **Frontiers in Neuroscience**. V. 12, 2018.

LICONA, H.K.; KARACAY, B.; MAHONEY, J.; McDONALD, E.; LUANG, T.; BONTHIUS, D.J. A single exposure to alcohol during brains development induces microencephaly and neuronal losses in genetically susceptible mice, but not in wild type mice. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 459-470, 2009.

LIEL, Y.; KRAUS, S.; LEVY, J.; SHANY, S. Evidence that estrogens modulate activity and increase the number of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8). **Endocrinology**, 130: 2597–2601, 1992.

LINDROS, K.O.; HILLBOM, M.E. Acetaldehyde in cerebrospinal fluid: its near-absence in ethanol-intoxicated alcoholics. **Med. Biol.**, v. 57, p. 246–247, 1979.

MAIER, S. & WEST, J. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. **Alcohol Res Health**. v. 25 (3), p. 168-174., 2001.

MANARI, A. P.; PREEDY, V. R.; PETERS, T. J. Nutritional intake of hazardous drinkers and dependent alcoholics in the UK. **Addict Biol**. v. 8, n. 2, p. 201-210, Jun2003.

MATEJUK, A.; ADLARD, K.; ZAMORA, A.; SILVERMAN, M.; VANDENBARK, A.A.; OFFNER, H. 17 $\beta$ -estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neurosci. Res.**, 65: 529–542, 2001.

MAY, P.A.; GOSSAGE, J.P.; KALBERG, W.O.; ROBINSON, L.K.; BUCKLEY, D.; MANNING, M.; HOYME, H.E. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. **Dev Disabil Res Rev**, v. 15(3), p. 176–192, 2009.

MCCANN, J. C. & AMES, B. N. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction? **FASEB J**. v. 22, n. 4, p. 982-1001, 2008.

MCGRATH, J.; FERON, F.; EYLES, D.; MACKAY-SIM, A. Vitamin D: the neglected neurosteroid? **Trends Neurosci**. v. 24 (10), p. 570–572, 2001.

MEDINA, A.; KRAHE, T.; COPPOLA, D.; RAMOA, A. Neonatal alcohol exposure induces long-lasting impairment of visual cortical plasticity in ferrets. **J Neurosci**. v. 23 (31), p. 10002-10012., 2003.

MEDINA, A. E.; KRAHE, T. E.; RAMOA, A. S. Early alcohol exposure induces persistent alteration of cortical columnar organization and reduced orientation selectivity in the visual cortex. **J Neurophysiol**. v. 93, n. 3, p. 1317-1325, Mar2005.

- MERCER, K.E.; WYNNE, R.A.; LAZARENKO, O.P.; LUMPKIN, C.K.; HOGUE, W.R.; SUVA, L.J.; CHEN, J.R.; MASON, A.Z.; BADGER, T.M.; RONIS, M.J. Vitamin D supplementation protects against bone loss associated with chronic alcohol administration in female mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 343, 401-412, 2012.
- MIKI, T.; HARRIS, S. J.; WILCE, P.; TAKEUCHI, Y.; BEDI, K. S. Neurons in the Hilus Region of the Rat Hippocampus Are Depleted in Number by Exposure to Alcohol During Early Postnatal Life. **HIPPOCAMPUS**, v. 10, p. 284–295, 2000.
- MILNE, M. & BARAN, D. T. Inhibitory Effect of Maternal Alcohol Ingestion on Rat Pup Hepatic 25-Hydroxyvitamin D Production. **PEDIATRIC RESEARCH**. v. 19 (1), p. 102-104, 1985.
- MÖYKKYNEN, T.; KORPI, E.R. Acute Effects of Ethanol on Glutamate Receptors. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 111, p. 4–13, 2012.
- MORRIS, Richard. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**. v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.
- MUHOOZI, G.K.M.; ATUKUNDA, P.; DIEP, L.M.; MWADIME, R.; KAAYA, A.N.; SKAARE, A.B. *et al.* Nutrition, hygiene, and stimulation education to improve growth, cognitive, language, and motor development among infants in Uganda: A cluster-randomized trial. **Matern Child Nutr**. 14(2): e125-27, 2018.
- NARVAEZ, C.J.; MATTHEWS, D.; BROUN, E.; CHAN, M.; WELSH, J. Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue. **Endocrinology**, 150, 651-661, 2009.
- NASHOLD, F.E.; SPACH, K.M.; SPANIER, J.A.; HAYES, C.E. Estrogen controls vitamin D3-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D3 metabolism and receptor expression. **J. Immunol.**, 183(6):3672–81, 2009.
- NIN, M. S. *et al.* Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: Grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, n. 1–3, p. 95–101, 2012.
- O'CONNOR, M. J. & PALEY, B. The relationship of prenatal alcohol exposure and the postnatal environment to child depressive symptoms. **J Pediatr Psychol**, v. 31, n. 1, p. 50-64, Jan-Feb2006.
- OSBORNE, P.G.; MATAGA, N.; ONOE, H.; WATANABE, Y. Behavioral activation by stimulation of a GABAergic mechanism in the preoptic area of rat. **Neurosci Lett**.158:201–4, 1993.
- PATTEN, A. R.; BROCARD, P. S.; CHRISTIE, B. R. Omega-3 supplementation can restore glutathione levels and prevent oxidative damage caused by prenatal ethanol exposure. **J Nutr Biochem**. v. 24, n. 5, p. 760-769, 2013.



PATTEN, A. R.; GIL-MOHAPEL, J.; WORTMAN, R. C.; NOONAN, A.; BROCARDO, P. S.; CHRISTIE, B. R. Effects of Ethanol Exposure during Distinct Periods of Brain Development on Hippocampal Synaptic Plasticity. **Brain Sci**, v. 3, n. 3, p. 1076-1094, 2013a.

PATTEN, A. R.; SICKMANN, H. M.; DYER, R. A.; INNIS, S. M.; CHRISTIE, B. R. Omega-3 fatty acids can reverse the long-term deficits in hippocampal synaptic plasticity caused by prenatal ethanol exposure. **Neurosci Lett**, v. 551, p. 7-11, 2013b.

PATTEN, A. R.; BROCARDO, P. S.; SAKIYAMA, C.; WORTMAN, R. C.; NOONAN, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R. Impairments in hippocampal synaptic plasticity following prenatal ethanol exposure are dependent on glutathione levels. **Hippocampus**, v. 23, n. 12, p. 1463-1475, 2013c.

PATTEN, A.R.; FONTAINE, C.J.; CHRISTIE, B.R. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. **Frontiers in pediatrics**. v. 2, p. 93, 2014.

PEDROSA, M.A.C.; CASTRO, M.L. Papel da Vitamina D na função neuromuscular. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 49(4):495-502, 2005.

PENAGINI, F.; BORSANI, B.; MARUCA, K.; GIOSIA, V.; BOVA, S.; MASTRANGELO, M.; ZUCCOTTI, G.V.; MORA, S. Short-Term Vitamin D3 Supplementation in Children with Neurodisabilities: Comparison of Two Delivery Methods. **Horm Res Paediatr**. 88:281–284, 2017.

PETERSON, D. R.; TABAKOFF, B. Characterization of brain acetaldehyde oxidizing systems in the mouse. **Drug Alcohol Depend.**, v. 4, p. 137–144, 1979.

PLAUT, S. M.; DAVIS, J. M. Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. **Physiology & Behavior**, 8(1), 43–51, 1972.

PLESKACHEVA, M. G. Temporal characteristics of grooming in an open field in two strains of rats. **International Journal of Comparative Psychology**. v. 9, n. 3, p. 105–116, 1996.

POPOVA, S.; LANGE, S.; BURD, L.; CHUDLEY, A.E.; CLARREN, S.K.; REHM, J. Cost of Fetal Alcohol Spectrum Disorder Diagnosis in Canada. **PLoS ONE**, v. 8(4), 2013.

QUERTEMONT, E.; ERIKSSON, C.J.; ZIMATKIN, S. M.; PRONKO, P.S.; DIANA, M.; PISANO, M.; RODD, Z.A.; BELL, R.R.; WARD, R.J. Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research**, v. 29, p. 1514–1521, 2005.

RAMANI, M.; MYLVAGANAM, S.; KRAWCZYK, M.; WANG, L.; ZOIDL, C.; BRIEN, J.; REYNOLDS, J. N.; KAPUR, B.; POULTER, M. O.; ZOIDL, G.; CARLEN, P. L. Differential expression of astrocytic connexins in a mouse model of prenatal alcohol exposure. **Neurobiol Dis**. v. 91, p. 83-93, 2016.

RICHARDSON, D.; BYRNES, M.; BRIEN, J.; REYNOLDS, J.; DRINGENBERG, H. Impaired acquisition in the water maze and hippocampal long-term potentiation after chronic prenatal ethanol exposure in the guinea-pig. **Eur J Neurosci**. v. 16 (8), p. 1593-1598, 2002.

- RILEY, E.P.; MCGEE, C.L. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 230, p. 357–365, 2005.
- ROBEL, S. & SONTHEIMER, H. Glia as drivers of abnormal neuronal activity. **Nat Neurosci.** v. 19, n. 1, p. 28-33, 2016.
- RONIS, M.J.; WANDS, J.R.; BADGER, T.M.; DE LA MONTE, S.M.; LANG, C.H.; CALISSENDORFF, J. Alcohol-induced disruption of endocrine signaling. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 31:1269–1285, 2007.
- ROTMAN, F. **Gravidez Sem Risco: A Nutrição Do Bebê In Útero.** Rio De Janeiro: Record, 1999.
- SANTORI, C.; CECCANTI, M.; DIACINTI, D.; ATTILIA, M. L.; TOPPO, L.; D'ERASMO, E.; ROMAGNOLI, E.; MASCIA, M. L.; CIPRIANI, C.; A.PRASTARO; CARNEVALE, V.; MINISOLA, S. Skeletal turnover, bone mineral density, and fractures in male chronic abusers of alcohol. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 31, p. 321-326, 2008.
- SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **Int J Prev Med.** 4(6): 624–630, 2013.
- SHANKAR, K.; HIDESTRAND, M.; HALEY, R.; SKINNER, R.A.; HOGUE, W.; JO, C.H.; SIMPSON, P.; LUMPKIN, C.K.; JR ARONSON, J.; BADGER, T.M. *et al.* Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats. **Endocrinology**, 147:166–178, 2006.
- SHANKAR, K.; LIU, X.; SINGHAL, R.; CHEN, J.R.; NAGARAJAN, S.; BADGER, T.M.; RONIS, M.J. Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25-dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1). **Endocrinology**, 149:1748–1756, 2008.
- SICKMANN, H. M.; PATTEN, A. R.; MORCH, K.; SAWCHUK, S.; ZHANG, C.; PARTON, R.; SZLAVIK, L.; CHRISTIE, B. R. Prenatal ethanol exposure has sex-specific effects on hippocampal long-term potentiation. **Hippocampus.** v. 24, n. 1, p. 54-64, 2014.
- SMIRNOFF, P.; LIEL, Y.; GNAINSKY, J.; SHANY, S.; SCHWARTZ, B. The protective effect of estrogen against chemically induced murine colon carcinogenesis is associated with decreased CpG island methylation and increased mRNA and protein expression of the colonic vitamin D receptor. **Oncol. Res**, 11: 255–264, 1999.
- SOFRONIEW, M. V. & VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.** v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.
- Spach, K. M., and C. E. Hayes. Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. **J. Immunol.** 175: 4119–4126, 2005.
- SPEEDING, S. Vitamin D and depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. **Nutrients.** v. 6, n. 4, p. 1501-1518, 2014.

SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; KALUEFF, A. V. 'Stressing' rodent self-grooming for neuroscience research. **Nat Rev Neurosci.** v. 17, n. 9, p. 591, Sep2016.

STAPLES, M.C.; ROSENBERG, M.J.; ALLEN, N.A.; PORCH, M.W.; SAVAGE, D.D. Impact of Combined Prenatal Ethanol and Prenatal Stress Exposure on Anxiety and Hippocampal-sensitive Learning in Adult Offspring. **Alcohol Clin Exp Res.** 37(12), 2013.

STOWELL, A.; HILLBOM, M.; SALASPURO, M.; LINDROS, K. O. Low acetaldehyde levels in blood, breath and cerebrospinal fluid of intoxicated humans as assayed by improved methods. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 132, p. 635–645, 1980.

STREISSGUTH, A.P.; BARR, H.M.; BOOKSTEIN, F.L.; SAMPSON, P.D.; OLSON, H.C. The long-term neurocognitive consequences of prenatal alcohol exposure: a 14-year study. **Psychol Sci.**, v. 10, p.186–190, 1999.

STREISSGUTH, A. & O'MALLEY, K. Neuropsychiatric implications and long-term consequences of fetal alcohol spectrum disorders. **Semin Clin Neuropsychiatry.** v. 5 (3), p. 177-190, 2000.

SWART, P. C.; RUSSELL, V. A.; DIMATELIS, J. J. Maternal separation stress reduced prenatal-ethanol-induced increase in exploratory behaviour and extracellular signal-regulated kinase activity. **Behav Brain Res.** v. 356, p. 470-482, 2018.

TABAKOFF, B.; ANDERSON, R.A.; RITZMANN, R.F. Brain acetaldehyde after ethanol administration. **Biochem. Pharmacol.**, v. 25, p. 1305–1309, 1976.

TAMPIER, L.; MARDONES, J. Catalase mediated oxidation of ethanol by rat brain homogenates. **IRCS Med.Sci.**, v. 7, p. 389, 1979.

TITTERNESS, A. K. & CHRISTIE, B. R. Prenatal ethanol exposure enhances NMDAR-dependent long-term potentiation in the adolescent female dentate gyrus. **Hippocampus.** v. 22, n. 1, p. 69-81, 2012.

TRINDADE, P.; HAMPTON, B.; MANHAES, A. C.; MEDINA, A. E. Developmental alcohol exposure leads to a persistent change on astrocyte secretome. **J Neurochem.** v. 137, n. 5, p. 730-743, 2016.

VARASCHIN, R. K.; AKERS, K. G.; ROSENBERG, M. J.; HAMILTON, D. A.; SAVAGE, D. D. Effects of the cognition-enhancing agent ABT-239 on fetal ethanol-induced deficits in dentate gyrus synaptic plasticity. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 334, n. 1, p. 191-198, 2010.

VILJAKAINEN, H.T.; NATRI, A.M.; KARKKAINEN, M.; HUTTUNEN, M.M.; PALSSA, A.; JAKOBSEN, J.; CASHMAN, K.D.; MOLGAARD, C.; LAMBERG-ALLARDT, C. A positive dose-response effect of vitamin D supplementation on site-specific bone mineral augmentation in adolescent girls: a double-blinded randomized placebo-controlled 1-year intervention. **J Bone Miner Res,** 21, 836-844, 2006.

VORHEES, Charles V.; WILLIAMS, Michael T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature protocols.** v. 1, n. 2, p. 848, 2006.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, 482-504, 1976.

WANG, B. *et al.* Zfp462 deficiency causes anxiety-like behaviors with excessive self-grooming in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 16, n. 2, p. 296–307, 2017.

WEZEMAN, F.H.; JUKNELIS, D.; HIMES, R.; CALLACI, J.J. Vitamin D and ibandronate prevent cancellous bone loss associated with binge alcohol treatment in male rats. **Bone**, 41:639–645, 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report alcohol and health**. 2014. Disponível em: <  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 29 set 2019.

WILSON, S. E. & CUDD, T. A. FOCUS ON: THE USE OF ANIMAL MODELS FOR THE STUDY OF FETAL ALCOHOL SPECTRUM DISORDERS. **Alcohol Research & Health**. v. 34 (1), p. 92-98, 2011.

WORKU, B.N.; ABESSA, T.G.; WONDAFRASH, M.; VANVUCHELEN, M.; BRUCKERS, L.; KOLSTEREN, P. *et al.* The relationship of undernutrition/psychosocial factors and developmental outcomes of children in extreme poverty in Ethiopia. **BMC Pediatrics**. 18-45, 2018.

ZAKHARI, S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. **Alcohol Research**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 2013.

ZIMATKIN, S.M.; BUBEN, A.L. Ethanol oxidation in the living brain. **Alcohol**, v. 42, p. 529–532, 2007.

ZIMATKIN, S.M.; PRONKO, S.P.; VASILIOU, V.; GONZALEZ, F.J.; DEITRICH, R.A. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 30, p. 1500–1505, 2006.

ZHOU, Y.; YE, R.Q.; CAI, D.H.; ZHANG, H. Effect of estrogen and progesterone on the expression of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors mRNA in the liver of ovariectomized rats. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, 22: 521–523, 2002.